

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude par AFLP-ADNc du profil de transcription induit chez *Arabidopsis thaliana* lors de l'élicitation par des fragments pectiques

Ghislain, Benjamin

Award date:
2005

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

Facultés des Sciences

**Etude par AFLP - ADNc du profil de transcription induit chez
Arabidopsis thaliana lors de l'élicitation par des fragments pectiques**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Benjamin GHISLAIN

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

FACULTE DES SCIENCES

Secrétariat du Département de Biologie

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20.

E-mail: Joelle.Jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

GHISLAIN Benjamin

Résumé

Dans le but de se défendre contre les attaques d'une grande gamme de pathogènes (virus, bactéries, champignons, nématodes, insectes,...), les plantes se sont équipées de substances chimiques et de barrières physiques aussi bien constitutives qu'induites. Afin de mettre en évidence l'activation ou, au contraire, la répression de gènes impliqués dans les mécanismes de défense des plantes, une technique d'étude différentielle de transcrits a été utilisée : l'AFLP-ADNc.

Des cellules d'*Arabidopsis thaliana* ont été traitées (pendant 10', 30' et 1h) avec des oligogalacturonides (OGA) possédant un degré de polymérisation ≥ 9 . Cette démarche a pour but de mimer l'action d'un pathogène qui, lorsqu'il entre en contact avec la cellule végétale, commence par dégrader la paroi cellulaire en libérant des fragments pectiques. Ces derniers constituent un signal de danger pour la cellule qui va activer ou réprimer certains gènes pour se défendre.

Une sélection de paires d'amorces générant des sorties AFLP-ADNc exploitables a été effectuée et les paires d'amorces suivantes ont été retenues : E01-M03, E02-M02, E02-M04 et E04-M04.

A partir du couple E04-M04, deux pics (150 pb et 614 pb), d'intensité de fluorescence relativement faible ont été identifiés comme appartenant à des fragments (TDF) présents dans la sortie contrôle (non élicitée) et absents dans la sortie test (élicitée). Ces TDF correspondraient donc à des gènes réprimés suite au traitement. Ces fragments n'ont malheureusement pas pu être clonés et séquencés.

Cependant, un pic appartenant aux deux sorties (test et contrôle) obtenues avec le couple d'amorces E04-M04 a été sélectionné, et le fragment correspondant d'une taille de 404 pb a pu être cloné, séquencé et identifié. Il s'agit d'un fragment correspondant au gène de la 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase, une enzyme intervenant dans la voie de biosynthèse des acides gras.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2005

Promoteur: P. Van Cutsem

« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. »

Remerciements

Albert Einstein

En premier lieu, je tiens à remercier tout particulièrement le professeur Pierre Van Cutsem de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir permis d'y réaliser ce mémoire.

Je tiens également à remercier ma tutrice, Marie Manguette. Merci pour son encadrement, sa disponibilité, son soutien, sa bonne humeur et son dernier coup de pouce.

Merci aux membres du jury de consacrer du temps à la lecture de ce mémoire.

Merci à tous les membres du labo pour leur sympathie et leurs nombreux conseils.

Un très grand merci à Pierre Cambier pour sa gentillesse et sa disponibilité. Merci Pierro.

Merci Françoise pour tes nombreuses recommandations en informatique.

Merci aussi à Cristina, Marie-Céline et Aurélien pour tous les bons moments passés ensemble et pour avoir servi de cobaye à mes nouveaux tours de magie.

Merci à Lionel (Chapo), Guillaume (Chapi), Damien, Jessica, Céciline, Pierre Hubermont « Pierre », Alipio, Guy, Bernard et Damien pour tous ces bons moments de détente passés ensemble.

Merci à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer de près ou de loin au cours de ces quatre années aux facultés.

Merci à mes parents pour m'avoir donné l'opportunité de faire ces quatre années d'études universitaires.

Merci à mes deux frères d'avoir été... mes deux frères.

Merci à mes grands-parents pour leurs encouragements.

Merci à Florence d'avoir supporté mes (trop) nombreuses sautes d'humeur. Merci d'avoir été là pour me soutenir.

Enfin, il me tient à cœur de remercier l'inventeur du café sans qui mes périodes de blocus et de rédaction de ce mémoire n'auraient pas été possibles.

A tous.... MERCI !!!

Liste des abréviations

° C	degré Celsius
μ	Micro (10 ⁻⁶)
A	adénine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire (cDNA en anglais)
AFLP	polymorphisme de longueur de fragments amplifiés
AG-I	arabinogalactane I
AGP	protéine arabinogalactane
APX	ascorbate peroxydase
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ASC	ascorbate
ATP	adénosine triphosphate
AVF	facteurs anti-viraux
Avr	avirulence
BSA	sérum albumine bovine
C	cytosine
CAT	catalase
Cf	<i>Cladosporium fulvum</i>
cm	centimètre
d	désoxy
Da	Dalton
dd	didésoxy
DD	<i>differential display</i>
DEPC	Diéthyl pyrocarbonate
DEPC	diéthyl pyrrocarbonate
DO	densité optique
DP	degré de polymérisation
ds	double brin
EDTA	Ethylènediamine-tétraacétate
EST	etiquette de gènes exprimés (<i>expressed sequence tags</i>)
g	gramme
G	guanine
GIP	protéine inhibitrice de glucanase
GRP	protéine riche en glycine
HG	homopolygalacturonane
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
HR	réponse d'hypersensibilité
HRGP	protéine riche en hydroxyproline
HSS	hybridation suppressive soustractive
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
kDa	kilo Dalton
kV	Kilo Volts
l	litre
LB	milieu Luria-Bertani
LRR	répétition riche en leucine

LTP	protéine de transfert de lipides
LZ	tirette à leucine (<i>leucine zipper</i>)
m	mili (10^{-3}) ou mètre
M	molaire
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
n	nano (10^{-9})
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NBS	site de fixation nucléotidique
NTP	nucléotide triphosphate
OGA	Oligo- α -Galacturonides
P	phosphate
P	phosphate
PAL	phénylalanine ammonia-lyase
pb	paire de bases
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PGIP	protéine inhibitrice de polygalacturonase
PMN	poly morpho nucléaire
PR	lié à la pathogenèse (<i>pathogenesis related</i>)
PRP	protéine riche en proline
R	résistance
RAPD	polymorphisme d'ADN par amplification aléatoire
RG-I	rhamnogalacturonane I
RG-II	rhamnogalacturonane II
RNS	espèces réactives de l'azote
ROS	espèces réactives de l'oxygène
rpm	rotation par minute
RT	rétrotranscription
SAGE	<i>serial analysis of gene expression</i>
SAR	résistance systémique acquise
Ser	sérine
SOD	superoxy dismutase
T	thymine
TDF	fragments dérivés de transcrits
TE	Tris-EDTA
Thr	thréonine
TIR	Toll-interleukin like receptor
TM	transmembranaire
TMV	virus de la mosaïque du tabac
UDP	uridine diphosphate
UDPG	UDP-glucose
UV	ultraviolet
WAK	Wall Associated Kinase
Xa	<i>Xantomonas</i>
XGA	xylogalacturonane
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galacopyranoside

Table des matières

Introduction

1.	Introduction générale.....	1
2.	Relation « Plante-pathogène ».....	3
2.1.	Compatibilité, incompatibilité et spécificité d'hôte	3
2.2.	Exemples illustrant le concept de « gène pour gène »	3
3.	La paroi végétale	4
3.1.	La cellulose	4
3.2.	L'hémicellulose	4
3.3.	La pectine (figure 2)	7
3.3.1.	Composition.....	7
3.3.2.	Organisation macromoléculaire des HG, RGI et RGII au sein de la paroi cellulaire	7
3.3.3.	Propriétés des pectines	8
3.4.	Autres composants de la paroi cellulaire.....	8
3.5.	Modèles ultrastructurels de la paroi	11
4.	Notion d'éléciteurs	11
4.1.	Définition	11
4.2.	Des fragments pariétaux comme molécules signales.....	11
4.3.	Perception des éléciteurs.....	12
4.4.	Réponses membranaires et cytosoliques	14
5.	Mécanismes de résistance.....	15
5.1.	Modification des propriétés physiques de la cellule	15
5.2.	Phytoalexines	15
5.3.	Protéines liées à la résistance	16
5.3.1.	Protéines liées à la pathogenèse.....	16
5.3.2.	Protéines inhibitrices de polygalacturonases (PGIP).....	17
5.3.3.	Protéines antivirales.....	19
5.3.4.	Protéines antifongiques	19
5.4.	Espèces réactives de l'oxygène et réponse hypersensible.....	19
5.4.1.	Espèces réactives de l'oxygène	19
5.4.2.	La réaction hypersensible.....	20
6.	Les méthodes d'analyse du transcriptome.....	22
6.1.	Méthodes d'analyse basées sur l'amplification PCR et le séquençage.....	22
6.1.1.	Le DD-RT-PCR ou Differential Display	22
6.1.2.	Le SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)	27
6.1.3.	L' HSS (Hybridation Suppressive Soustractive)	27
6.1.4.	L' AFLP-ADNc.....	29
6.2.	Méthodes d'analyse basées sur l'hybridation : les puces à ADN	30
6.2.1.	Considérations générales	30
6.2.2.	Les macroarrays.....	31
6.2.3.	Les microarrays d'ADNc	31
6.2.4.	Les microarrays d'oligonucléotides.....	31

6.2.5. Potentiel et limitations de ces puces	32
7. But de ce travail.....	33

Matériel et méthodes

1. Culture d' <i>Arabidopsis thaliana</i> écotype Landsberg erecta (L-MM 1).....	34
1.1. Composition du milieu de culture	34
1.1.1. Milieu MSMO	34
1.1.2. Milieu d'élicitation	34
1.2. Conditions de culture	35
2. Préparation de l'éliciteur	35
2.1. Production des oligogalacturonides	36
2.2. Analyse des oligogalacturonides par HPLC.....	36
3. Elicitation des cellules d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
4. Clonage des fragments dérivés de transcrits	38
4.1. Dosage des acides nucléiques	38
4.1.1. Dosage	38
4.1.2. Pureté de l'ARN	38
4.2. Electrophorèse horizontale sur gel d'agarose.....	38
4.3. Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADNc	39
4.3.1. Extraction des ARN totaux au TriPure™.....	39
4.3.2. Synthèse d'ADNc	40
4.4. AFLP sur ADNc.....	40
4.4.1. Restriction de l'ADNc et ligation d'adaptateurs.....	41
4.4.2. Amplification présélective	41
4.4.3. Amplification sélective.....	43
4.4.4. Séparation des TDF marqués par électrophorèse capillaire	44
4.5. Purification des produits d'amplification AFLP	44
4.6. Culture d' <i>Escherichia coli</i>	44
4.6.1. Milieu LB.....	44
4.6.2. Milieu SOC.....	45
4.7. Clonage dans le plasmide pCR II.....	45
4.7.1. Ligation des produits d'amplification	45
4.7.2. Transformation des bactéries	45
4.7.3. Criblage « blanc-bleu » des plasmides recombinants	46
5. Analyse des colonies	47
5.1. Réaction PCR de sélection sur colonies.....	47
5.2. Détermination précise de la taille des inserts	31
5.3. Séquençage des inserts d'intérêt	47

Résultats et discussion

1. Introduction	48
2. Stimulation des cellules en suspension d' <i>Arabidopsis thaliana</i> écotype Landsberg erecta (L-MM 1) par les oligogalacturonides.....	49

3.	Détermination de gènes différentiellement exprimés.....	49
3.1.	Introduction.....	49
3.2.	Isolement des ARN totaux des cellules traitées et non traitées.....	52
3.3.	Synthèse d'ADNc double brin	53
3.4.	AFLP-ADNc	54
3.4.1.	Amplification sélective : mise au point	54
3.4.2.	Identification de pics différentiellement présents	57
4.	Clonage des fragments d'intérêt.....	59
4.1.	Introduction.....	59
4.2.	Clonage direct des fragments marqués.....	59
4.3.	Clonage des fragments non marqués.....	60
4.3.1.	Amplification du produit d'amplification présélective	60
4.3.2.	Purification du produit d'amplification sélective.....	60
4.3.3.	Criblage des colonies	61
4.4.	Validation de la technique.....	62
4.4.1.	Sélection de pics en vue du criblage	63
4.4.2.	Recherche des clones correspondant aux fragments sélectionnés	63
4.4.3.	Détermination précise de la taille des inserts.....	64
4.4.4.	Séquençage de l'insert de la colonie 26.....	65
4.5.	Tentative de détermination du pic à 614 pb	65
4.5.1.	Recherche du clone d'intérêt	65
4.5.2.	Détermination précise de la taille des inserts.....	66
	Conclusions et perspectives	67
	Bibliographie.....	69

Introduction

1. Introduction générale

Les plantes sont souvent parasitées par des virus, des bactéries, des champignons, des nématodes, des insectes et parfois même par d'autres plantes. Leur immobilité leur interdisant toute perspective de fuite, les végétaux ont développé au cours de l'évolution de nombreux mécanismes de défense tant constitutifs qu'induits. Ce type de stratégie est à comparer avec le système immunitaire des vertébrés. Celui-ci met en jeu de nombreuses cellules spécialisées (macrophages, PMN, lymphocytes,...) ayant la capacité de se déployer rapidement, via le système circulatoire, au niveau du site d'infection afin de tenter d'anéantir l'organisme étranger, ou du moins de stopper sa progression. Les plantes ne disposent bien entendu pas d'un tel système circulatoire mais, néanmoins, ont la capacité de lutter efficacement contre une attaque, même très localisée, par une batterie de pathogènes différents.

L'intérêt de l'étude des mécanismes développés par la plante afin de lutter contre un phytopathogène donné est double. Premièrement, elle permet de comprendre les voies de signalisation par lesquelles une cellule végétale tente de répondre efficacement à un stress. Existe-t-il des voies communes en réponse à des stress biotiques (causés par un pathogène), et abiotiques (salins, mécaniques, thermiques, ...) ? Ou au contraire, peut-on mettre en évidence des voies spécifiques de tel ou tel stress ? Deuxièmement, une telle étude peut renseigner sur le dialogue développé entre deux organismes n'appartenant pas au même règne. Par quels moyens communiquent-ils ? Comment évolue le dialogue ? Qui aura le dernier mot ? Autant de questions passionnantes auxquelles la phytopathologie tente d'apporter une réponse. Signalons enfin que ce genre d'étude débouche tout naturellement sur le domaine plus appliqué de la défense des végétaux. Les recherches actuelles visent en effet à identifier des signaux capables d'activer les défenses naturelles des plantes afin de les intégrer dans une nouvelle conception des moyens de défense des végétaux.

Dans le cadre de ce mémoire, je tenterai de mettre en évidence par une technique récente, l'AFLP-ADNc, l'induction ou la répression de gènes au sein de cellules en suspension d'*Arabidopsis thaliana* ayant subi un stress mimant une attaque pathogène.

	AV	av
R	Incompatible	<i>Compatible</i>
r	<i>Compatible</i>	<i>Compatible</i>

Figure 1. Schéma illustrant le déroulement d'une interaction plante-pathogène selon la règle de la relation « gène pour gène ». AV, facteur d' avirulence ; R , facteur de résistance.

Pathogen	AVR protein	Virulence function	Third component	R protein	Host
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	AvrBs2	Required for full virulence	?	Bs2	Pepper
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	AvrPto	Enhances virulence in tomato	Pto	Prf	Tomato
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	AvrPphB	Weak browning upon expression in bean	PBS1	RPS5	<i>Arabidopsis</i>
<i>P. syringae</i> pv. <i>psi</i>	AvrRps4	Unknown	?	RPS4	<i>Arabidopsis</i>
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	AvrRpt2	Promotes virulence	p75	RPS2	<i>Arabidopsis</i>
<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	AvrRpm1	Required for virulence on <i>Arabidopsis</i>	RIN4	RPM1	<i>Arabidopsis</i>
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	AvrB	Triggers chlorosis	RIN4	RPM1	<i>Arabidopsis</i>
<i>M. grisea</i>	AVR-Pita	Predicted zinc metalloprotease	No	Pi-ta	Rice
<i>C. fulvum</i>	AVR2	Unknown	Rcr3	Cf-2	Tomato
<i>C. fulvum</i>	AVR4	Unknown	?	Cf-4	Tomato
<i>C. fulvum</i>	AVR9	Unknown	HAB5	Cf-9	Tomato
Potato Virus X	CP	Coat protein	?	Rx1, Rx2	Potato
Turnip crinkle virus	CP	Coat protein	TIP	HRT	<i>Arabidopsis</i>
Tobacco mosaic virus	Replicase	Replicase/helicase	?	N	Tobacco

Tableau 1. Quelques interactions « gène pour gène » bien caractérisées (Luderer and Joosten, 2001).

2. Relation « Plante-pathogène »

2.1. *Compatibilité, incompatibilité et spécificité d'hôte*

Tout au long de son existence, la plante est en contact avec une grande variété de pathogènes. Le développement d'une pathologie constitue toutefois une exception, conséquence de l'incroyable capacité du végétal à mettre en œuvre de façon efficace et coordonnée une batterie de défenses dites passives et actives.

Suite au contact, direct ou indirect (via des sécrétions enzymatiques par exemple) entre le pathogène et le végétal, un dialogue moléculaire va s'établir rapidement entre ces deux protagonistes. Dès lors, deux types de relation peuvent se mettre en place. L'une sera dite **compatible** lorsque l'envahisseur « l'emporte » sur la plante-hôte en colonisant les tissus végétaux, ceci conduisant naturellement au développement d'une maladie plus ou moins grave suivant le type de pathogène. L'autre type de relation, beaucoup plus fréquente sera dite **incompatible** lorsque la progression, le développement et la croissance du pathogène sont stoppés par la mise en place d'un arsenal de défense.

Lorsqu'une relation incompatible s'établit entre ces deux acteurs, on distingue deux types de réponses. On parlera d'une part de **résistance non hôte spécifique** lors du développement d'une résistance par une même espèce de plante à l'encontre de n'importe quel type de parasite ou pathogène. Cette forme de résistance est la plus courante. D'autre part une **résistance hôte spécifique** ne se développera que pour un type bien particulier de pathogène, de plante hôte ou des deux simultanément. Ce dernier type de relation incompatible fait intervenir la notion de « gène pour gène » (figure 1). En effet, cette incompatibilité est sous-tendue par des caractères monogéniques dominants correspondant l'un à l'autre et désignés par la lettre **R** (pour résistance) chez la plante hôte et par **Avr** (pour avirulence) chez le pathogène (d'où la notion de « gène pour gène ») (Esquerré-Tugayé, 2001). Toute autre association impliquant les allèles récessifs de ces gènes (*r* et *avr*) conduit inévitablement à une compatibilité et donc à la maladie.

2.2 *Exemples illustrant le concept de « gène pour gène »*

A ce jour, un grand nombre de gènes *R* et *Avr* ont été clonés. Les protéines encodées par les gènes *R* sont remarquablement similaires et peuvent être classées suivant leurs domaines structuraux et leur localisation (Takken and Joosten, 2000). Par contraste, les produits des gènes *Avr* ne présentent pas de similarités évidentes. Le nombre de gènes *R* pour lesquels un gène *Avr* correspondant a été cloné continue d'augmenter. Par contre, le nombre de relations « hôte-pathogène » pour lesquelles une interaction directe entre les protéines *R* et *Avr* a été démontrée est encore relativement limitée. Ceci suggère que, dans de nombreux cas, la perception des protéines *Avr* par leurs protéines *R* correspondantes est indirecte et nécessite de ce fait l'intervention d'un troisième acteur. La nature de ce troisième composant reste encore imprécise.

Le tableau 1 présente une série d'interactions « gène pour gène » bien caractérisées en mentionnant à chaque fois le nom des protéines *Avr* et *R* impliquées (Lude and H.A.J. Joosten, 2001).

3 La paroi végétale

Tous les phytopathogènes sans exception interagissent à un moment ou à un autre avec la paroi cellulaire. De façon simplifiée, cette dernière constitue une barrière physique entre ces pathogènes et le protoplaste. C'est également cette paroi cellulaire qui permet d'expliquer nombre de différences existant entre le monde animal et le monde végétal (nutrition, digestion, osmorégulation, croissance, reproduction, communication intercellulaire, morphologie,...). Bien que la composition chimique et la structure physique de la paroi diffèrent énormément d'un groupe végétal à un autre, d'un type cellulaire à un autre et même d'un stade de développement à un autre, il est possible de donner une description exhaustive des principaux composants de cette paroi. Classiquement, la paroi cellulaire végétale d'une dicotylédone modèle contient des polysaccharides (~30% de cellulose, 30% d'hémicellulose et 35 % de pectine), des glycoprotéines de structures (2 à 10%), des esters phénoliques (<2%), des minéraux (1 à 5 %) et des enzymes.

3.1. La cellulose

La cellulose est une molécule linéaire résultant de la polymérisation d'un grand nombre (entre 500 et 4500) de $\beta(1-4)$ -D-glucanes. Ces polymères s'assemblent via des interactions faisant intervenir des ponts hydrogènes afin de former des microfibrilles de cellulose. Chaque microfibrille, composée d'environ 36 chaînes polysaccharidiques, s'associe afin de former une fibrille cellulosique d'un diamètre plus conséquent compris entre 5 et 7 nm (Delmer and Amor, 1995). La biosynthèse de cellulose, contrairement à celle des autres polysaccharides pariétaux, a lieu *in situ*, au niveau de la membrane plasmique, sous l'action d'un complexe en rosette utilisant l'UDP-D-glucose comme précurseur actif. Ce précurseur peut être formé à partir d'hexoses phosphate par une UDP-glucose pyrophosphorylase ou encore à partir de sucrose via une sucrose synthase.

La paroi cellulaire végétale contient également des polysaccharides non cellulosiques. Ces polymères comprennent des hexoses, des pentoses et des acides uroniques. Le précurseur de tous ces polysaccharides est, encore, l'UDP-glucose. Contrairement à la cellulose, ces polysaccharides sont formés dans l'appareil de Golgi et sont exportés via des vésicules golgiennes à la surface de la membrane plasmique. La synthèse de la paroi cellulaire requiert donc la présence de ces deux systèmes.

3.2. L'hémicellulose

Le terme hémicellulose est classiquement utilisé afin de désigner les polysaccharides pariétaux pouvant être solubilisés en milieu alcalin. Suivant cette brève définition, les hémicelluloses regroupent les xyloglucanes, les xylanes (glucuronoxylanes, arabinoxylanes et glucuronoarabinoxylanes), les mannanes (glucomannanes ; galactomannanes et galactoglucomannanes) et les arabinogalactanes. Les hémicelluloses sont biochimiquement proches de la cellulose dans ce sens où elles possèdent également un squelette composé de résidus β -D-pyranosyl liés en β -1,4. On retrouve ainsi du glucose, du mannose et du xylose. L'hémicellulose a également la capacité de se lier fortement aux microfibrilles de cellulose via des liaisons hydrogène.

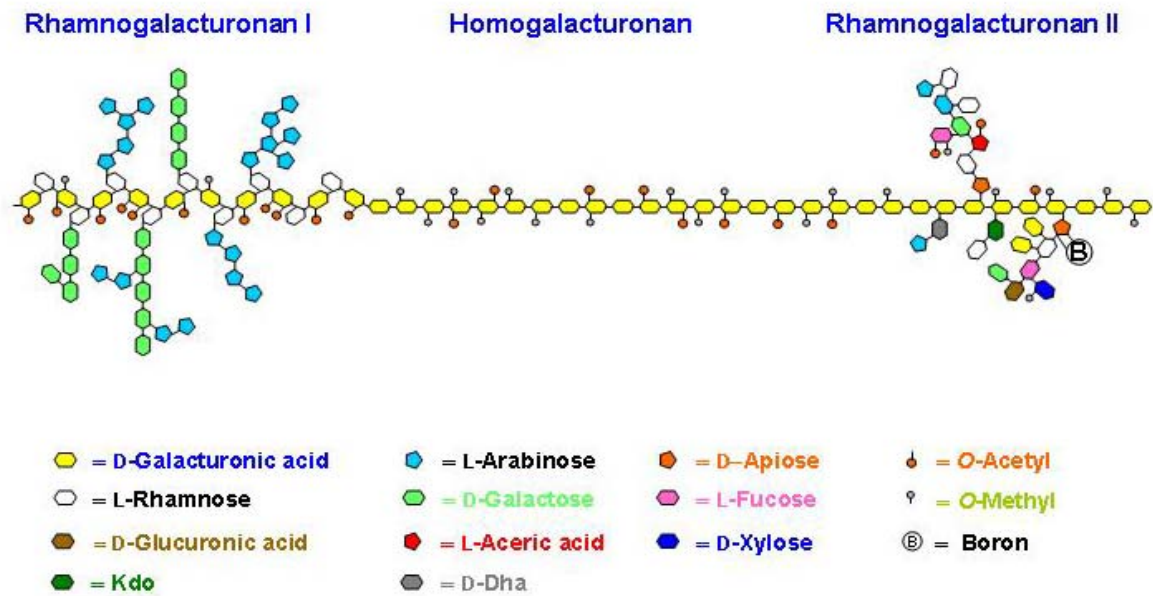


Figure 2. Composition de la pectine pariétale. La pectine est un polysaccharide complexe constitué d'homopolygalacturonanes, de rhamnogalacturonanes I et de rhamnogalacturonanes II.

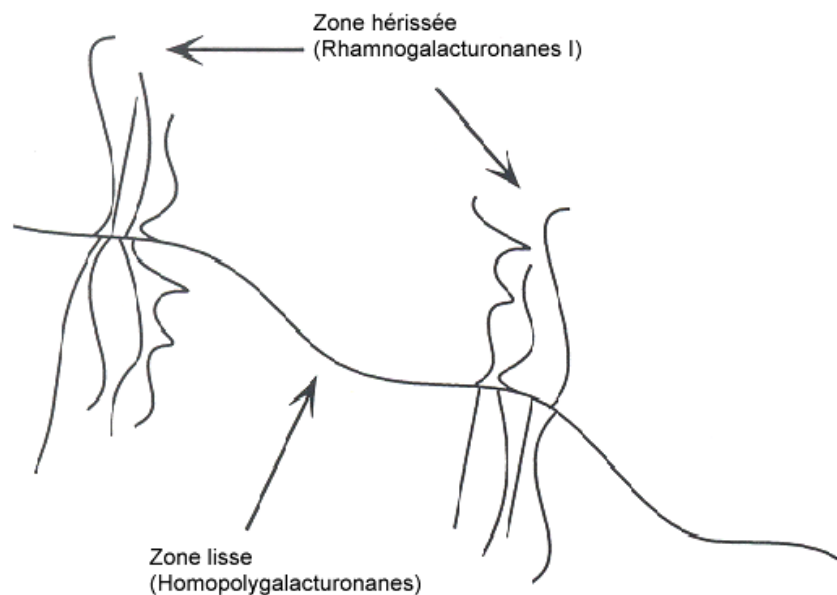


Figure 3. Représentation schématique de la pectine reprenant les zones lisses composées presque exclusivement d'acide galacturonique en liaison α -1,4- ; et, les zones hérissées composées de rhamnogalacturonanes I dans lesquelles acides des galacturoniques alternent avec des résidus rhamnose.

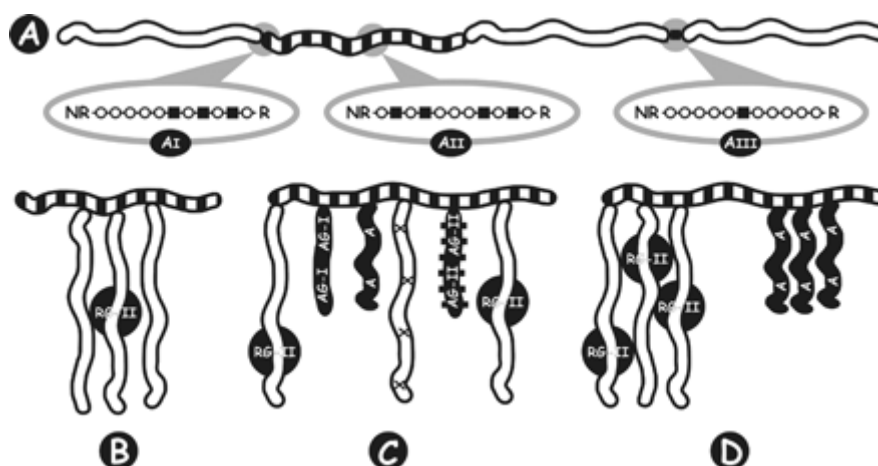


Figure 4 ; Représentation schématique de la structure macromoléculaire de la pectine. A, Dans le modèle classique, le squelette pectique est une chaîne étendue contenant des région d'HG et de rhamnogalacturonanes I (RG-I) (Visser and Voragen, 1996). Les régions composées d'HG peuvent être interrompue par des résidus rhamnose. Les régions « lisses » sont composées principalement d'HG tandis que les régions « hérissées » sont composées de RG-I, de xylogalacturonane (XGA), d'arabinane et d'arabinogalactane I (AG-I). Pour la clarté du schéma, les XGA, arabinanes et AG-I ne sont pas représentés. AI, AII et AIII illustrent respectivement la transition des HG aux RG-I, les régions de rhamnogalacturonanes avec un rapport acide galacturonique (GalA) sur rhamnose (Rha) inférieur à 1, et un Rha interrompant une chaîne d'HG. R, extrémité réductrice ; NR, extrémité non réductrice.

De B à D, Différents modèles d'organisation de la pectine selon Vincken et ses collaborateurs dans lesquelles le RG-I est « décoré » avec des chaînes latérales neutres (AG-I, arabinane et peut être arabinogalactane II (RG-II)) et composées de HG et d'XGA. La façon dont les HG et les XGA sont attachés au RG-I n'est pas encore connue. Trois modèles structurels sont avancés. Dans le premier (B), il existerait des molécules de pectine composées d'une seule sorte de chaîne latérale. Dans le deuxième modèle (C) plusieurs chaînes latérales sont distribuées aléatoirement sur le RG-I. Enfin, le dernier modèle (D) postule que les chaînes latérales sont groupées par type de polysaccharide. (Vincken *et al.*, 2003). Pour les symboles, voir figure 4'.

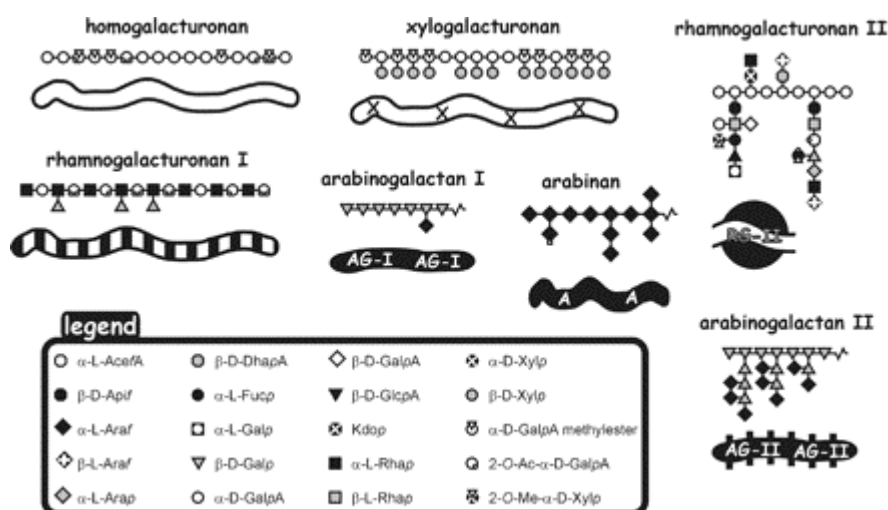


Figure 4'. Représentation schématique des polysaccharides présents dans la pectine (Vincken *et al.*, 2003)

3.3. La pectine (figure 2)

3.3.1. Composition

Le terme de pectine est utilisé pour désigner la fraction de la paroi cellulaire contenant de l'acide galacturonique (Vorwerk *et al.*, 2004). Le polysaccharide pectique le plus abondant est sans conteste le rhamnogalacturonane I (RGI), composé d'un squelette présentant une alternance de rhamnose et d'acide galacturonique. Les résidus rhamnose peuvent être substitués en O-4 par différents sucres neutres comme le galactose ou l'arabinose (Ridley *et al.*, 2001). Ces chaînes latérales peuvent se composer d'un seul sucre ou d'un polymère tel l'arabinogalactane I (AG-I) ou l'arabinane. Les trois autres composants majeurs ayant un squelette principal composé d'acides galacturoniques attachés par des liaisons -1,4- sont l'homogalacturonane (HG), le xylogalacturonane (XGA) et le rhamnogalacturonane II (RGII).

L'homogalacturonane (HG) est une chaîne linéaire composée de résidus d'acide α -D-galactopyranosyluronic possédant des groupements carboxyles pouvant être méthyle-estérifiés. Les HG peuvent également, suivant le type végétal, être O-acétylés en C-3 ou en C-2 (Ishii, 1995, 1997a ; Perrone *et al.*, 2002). Contrairement aux HG linéaires, le squelette d'acide galacturonique des xylogalacturonanes (XGA) contient des chaînes latérales composées de résidus xylose de longueurs variant d'une espèce végétale à l'autre (Huisman *et al.*, 2001). Il est intéressant de mentionner que des résidus rhamnose peuvent interrompre la chaîne de résidus d'acide α -D-galactopyranosyluronic en introduisant, à l'instar des résidus proline dans un peptide, un « coude » dans l'alignement de la molécule.

Le rhamnogalacturonane II, quant à lui, possède également un squelette d'acides galacturoniques mais contient quatre chaînes latérales différentes composées d'une variété de résidus saccharidiques. Parmi ces résidus, on retrouve des sucres rares tels l'apiose, l'acide acérique, l'acide 3-déoxy-D-lyxo-heptulosarique et l'acide 2-kéto-3-déoxy-D-manno-octulosonique (Perez *et al.*, 2003).

3.3.2. Organisation macromoléculaire des HG, RGI et RGII au sein de la paroi cellulaire

Un grand nombre d'indices expérimentaux laissent à penser que l'homogalacturonane, le RG-I et le RG-II sont liés de façon covalente. En effet, ces trois polysaccharides sont solubilisés à partir de la paroi végétale via un traitement avec une solution tampon qui hydrolyse les liaisons covalentes ou des agents chélatant le calcium, mais ne se séparent pas suite à une chromatographie par exclusion de taille. Enfin, des fractions enrichies en HG, RG-I et RG-II sont générées après traitement de la paroi avec une endopolygalacturonase, enzyme qui clive spécifiquement les liaisons -1,4- entre les résidus d'acide α -D-galactopyranosyluronic.

Le modèle classique d'organisation des divers composants de la pectine au sein de la paroi végétale indique que le squelette pectique est une longue chaîne composée de régions faites d'HG et de RG-I (Visser and Voragen, 1996). Cette chaîne peut être divisée en deux régions morphologiquement distinctes (figure 3). La première appelée « région lisse » est principalement composée d'HG. Ces régions ont la capacité de s'associer coopérativement en présence de cations bivalents tel le Ca^{2+} et de former ainsi un réseau relativement rigide décrit par le modèle de la « boîte à œufs » ou « egg-box ». La deuxième appelée « région hérissée » est quant à elle composée de RG-I, XGA, d'arabinanes et d'arabinogalactanes I. Un nouveau modèle encore discutable (figure 4) propose que l'HG ainsi que les autres constituants de la pectine sont en fait des chaînes latérales du RG-I (Vincken *et al.*, 2003).

3.3.3. Propriétés des pectines

Une des grandes caractéristiques des pectines est qu'elles peuvent former des gels de type soit « acide », soit ionique. Dans le premier type de gel dit « acide », les pectines protonées sont associées entre elles par des ponts hydrogènes. De nombreux facteurs, dont un pH acide, l'ajout de sucre, la méthylation des fonctions carboxyliques, etc... influencent la formation de tels gels. Le second type de gel quant à lui fait intervenir les parties homopolysaccharidiques des pectines. Ces dernières sont en effet associées entre elles par des ions bivalents et principalement du calcium. Ces gels ioniques ont été décrits par différents modèles dont le plus remarquable est celui de Morris *et al.* (1982) et Powell *et al.* (1982). Ces auteurs proposent une association en deux étapes (figure 5). Dans un premier temps, deux chaînes pectiques s'associeraient de manière coopérative par le biais d'ions calcium. La seconde étape correspond à l'association des chaînes dimérisées suite à une augmentation de la concentration en calcium. Il y aurait donc formation de multimères. Cependant, l'énergie de liaison de ces associations de dimères en multimères serait plus faible que l'énergie requise pour la formation de dimères : les associations multimériques entre seraient donc moins stables que les dimères.

Signalons enfin que Liners *et al.* (1992) ont proposé, suite à l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre une conformation supramoléculaire d'homopolysaccharides, conformation induite par le calcium, qu'une séquence ininterrompue d'au minimum neuf résidus d'acide galacturonique est nécessaire pour chaque chaîne afin qu'elles puissent dimériser. Dans cette configuration, ces deux chaînes partageraient cinq ions calciums.

3.4. Autres composants de la paroi cellulaire

Mis à part les polysaccharides, la paroi végétale contient également des glycoprotéines de structure (Josè-Estanyol and Puigdomènech, 2000). Ces protéines O-glycosylées regroupent entre autres des protéines riches en hydroxyproline (HRGP, autrefois appelées extensines), riches en proline (PRP) et riches en glycine (GRP). Un autre type de protéine est présent dans cette paroi cellulaire : les protéines arabinogalactanes (arabinogalactan proteins ou AGPs). Ces protéoglycanes peuvent être liés à la membrane plasmique par une ancre glycosylphosphatidylinositol ou présents dans l'apoplaste. Outre ces glycoprotéines ou ces protéoglycanes, la paroi cellulaire contient de nombreuses enzymes (Fry, 1995), y compris celles impliquées dans le métabolisme de la paroi (endo- et exoglycanases, méthyl- et acétyl estérases et transglycosylases) et celles, telles les peroxydases, pouvant réticuler entre eux les différents composants pariétaux. Enfin signalons la présence de minéraux dont la composition dépend fortement des conditions de croissance de la plante. Ces minéraux (Ca, K, Na, Fe, Mg, Si, Zn et B) peuvent représenter jusqu'à 5% du poids sec de la paroi des dicotylédones (Epstein, 1999). Ils sont généralement retenus électrostatiquement sur les charges anioniques des polymères pectiques, voire hémicellulosiques.

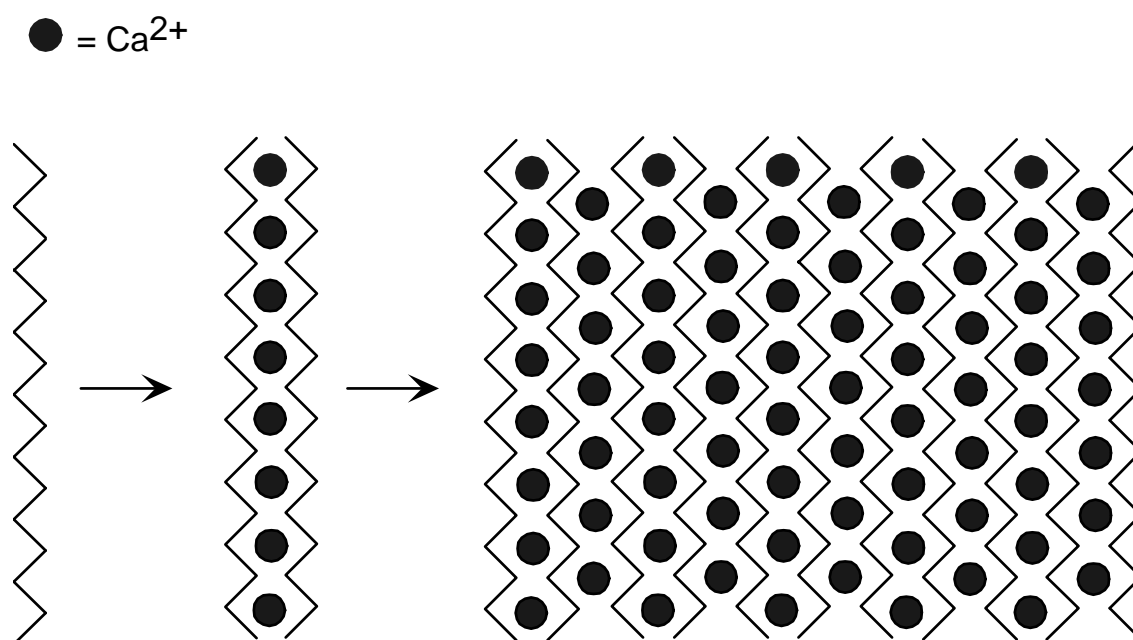


Figure 5. Formation d'association dimérique et multimérique entre zones lisses homopolygalacturoniques de chaînes de pectine en présence de concentrations croissantes en calcium.

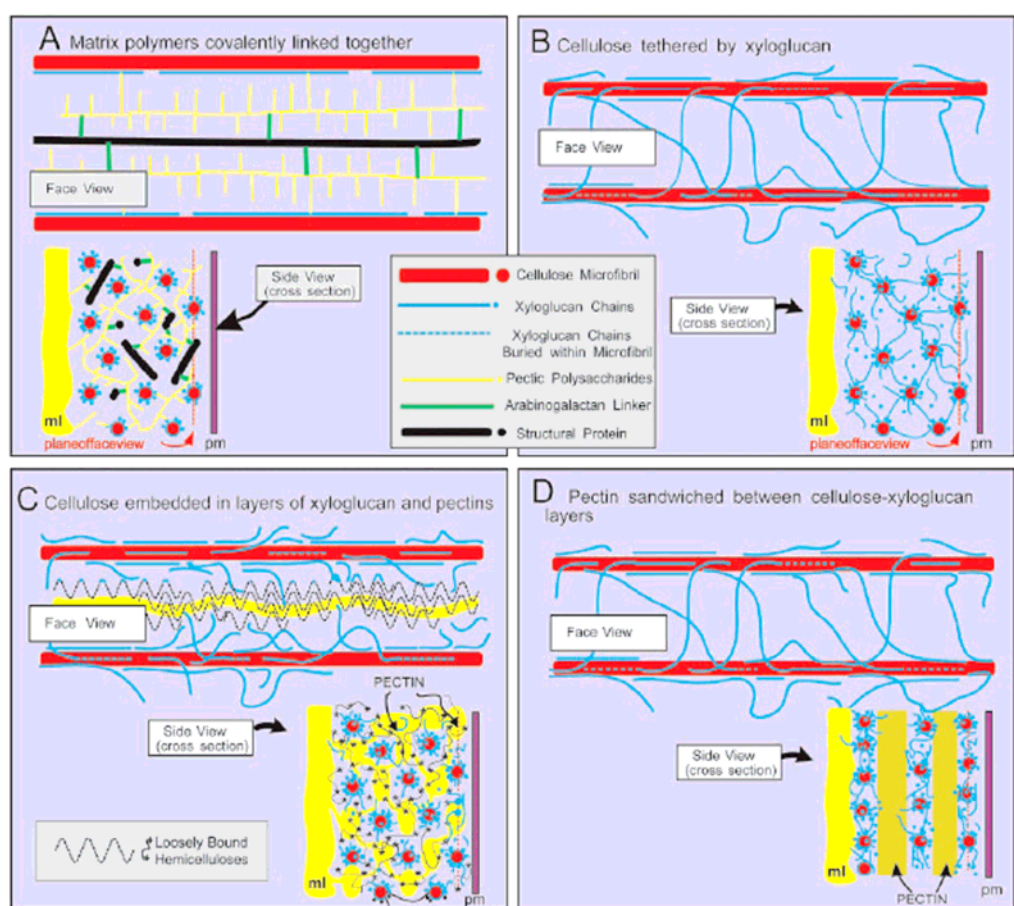


Figure 6. Modèles alternatifs de la structure de paroi cellulaire végétale. A, le modèle de Keegstra *et al.* dans lequel la cellulose se lie à la matrice polysaccharidique via les ponts hydrogènes qu'elle partage avec les xyloglucanes. B, le modèle de Hayashi dans lequel les chaînes de xyloglucanes remplissent les espaces entre les microfibrilles tout en les reliant ensemble. Les polysaccharides pectiques ainsi que les protéines de structure ne sont pas représentés mais se trouvent entre les chaînes de xyloglucanes. C, le modèle de Talbott et Ray dans lequel la cellulose est recouverte par des couches successives de composants de la matrice polysaccharidique. D, le modèle de la paroi « stratifiée » de Ha *et al.* dans lequel des strates de polysaccharides pectiques séparent les lamelles composées de cellulose et de xyloglucane. pm, membrane plasmique ; ml, lamelle mitoyenne.

Eliciteurs					
Eliciteurs physiques	Blessure				
Eliciteurs chimiques	Abiotiques	Ions métalliques (lanthane, europium, cadmium, argent,...), oxalate,...			
	Biotiques	Composition complexe	Paroi de levure, paroi de mycélium, spores fongiques,...		
		Composition simple et définie	Hydrates de carbone	Polysaccharides	Alginates
					Pectines
					Chitosans
			Protéines	Oligosaccharides	Galacturonides
				Peptides	Glutathione
				Protéines	Cellulase, Elicitrine,...
			Lipides		Lipopolysaccharide
			glycoprotéines		Non caractérisé
			Molécules volatiles		C ₆ -C ₁₀

Tableau 2. Classification des principaux éliciteurs de plantes (Radman *et al.*, 2003)

3.5. Modèles ultrastructuraux de la paroi

Plusieurs modèles différents ont été proposés afin de caractériser l'ultrastructure de la paroi cellulaire végétale (figure 6). Parmi eux, les plus précoces prédisent que la plupart des polymères constituant la matrice pariétale (xyloglucanes, pectine et glycoprotéines) sont liés de façon covalente les uns aux autres. Dans ce genre de modèle, la cellulose se lie à la matrice polysaccharidique via les ponts hydrogènes qu'elle partage avec les xyloglucanes (Keegstra *et al.*, 1973). Cependant, le manque de preuves de l'existence d'un lien covalent entre les différents constituants de la matrice amena à remettre en question ces premiers modèles.

Actuellement, les modèles plus récents (Hayashi, 1989 ; McCann *et al.*, 1992 ; Talbott and Ray, 1992 ; Ha *et al.*, 1997) mettent l'accent sur les interactions non covalentes entre les polymères pariétaux et proposent l'existence de deux réseaux indépendants mais en interaction. Le premier réseau serait composé de polysaccharides pectiques (HG, RG-I et RG-II). Le second réseau, le plus important, serait composé, quant à lui de cellulose et de xyloglucane. Enfin, un réseau additionnel viendrait se superposer aux deux premiers et serait composé de glycoprotéines pariétales.

4. Notion d'éliciteurs

4.1. Définition

Depuis 1970, il a été montré que de petits fragments de polysaccharides et de protéines en provenance du pathogène pouvaient jouer le rôle d'« éliciteur », déclenchant la synthèse de phytoalexines au niveau du site d'infection. Le terme « éliciteur » fut proposé par Keen en 1975 lors de l'étude de l'effet d'une culture liquide de *Phytophthora megasperma* sur la production de phytoalexines chez le soja. Depuis lors, de nombreuses publications ont démontré le pouvoir éliciteur de nombreux autres composés sur une large gamme de cultures cellulaires végétales. En 1977, Albersheim et ses collaborateurs (Albersheim *et al.*, 1977) ont étudié l'effet d'oligosaccharides microbiens sur les plantes et en 1985 Darvill *et al.* proposèrent le nom d'« oligosaccharine » afin de définir ces sucres éliciteurs.

Les différents éliciteurs découverts à ce jour peuvent être classifiés en grandes catégories. On parlera donc d'éliciteurs physiques ou chimiques, biotiques ou abiotiques, complexes dans leur composition ou bien de composition définie (tableau 2).

4.2. Des fragments pariétaux comme molécules signales

De nombreux pathogènes pénètrent directement dans la paroi cellulaire afin d'accéder aux nutriments qu'elle contient. Bien que certains micro-organismes soient capables de développer une force mécanique suffisante pour pénétrer cette barrière rigide, la plupart de ces envahisseurs sécrètent des enzymes qui dégradent cette paroi cellulaire végétale. Parmi ces enzymes, on retrouve des pectine acétyl- et méthylestérases qui dé-estérifient la pectine afin de la rendre plus accessible aux enzymes lytiques. Une grande variété d'enzymes incluant des cellulases, glucanases, endopolygalacturonases et endopectate lyases, pectine lyases, xylogalacturonases, galactanases, arabinases, RGlases, et une série d'autres enzymes

dégradant le RGII sont sécrétées par le pathogène. La plante sécrète également des chitinases et des glucanases qui sont directement dirigées contre la paroi des pathogènes fongiques.

Comme vu précédemment, c'est en 1970 que Peter Albersheim et ses collègues mirent en évidence que des fragments de paroi cellulaire de champignon avaient la capacité d'induire la production de phytoalexines au niveau du site d'invasion. Des oligosaccharides provenant des polysaccharides de la paroi végétale ont également la capacité d'induire des réponses de défense chez le végétal (Hahn *et al.*, 1981). Les oligosaccharides les plus étudiés sont les Oligo- α -Galacturonides (OGA). Ce sont les produits de dégradation des homopolygalacturonanes (HG), constituants de la pectine (Ridley *et al.*, 2001). Par contraste avec le haut degré de spécificité structurelle des éliciteurs provenant des parois fongiques, les éliciteurs dérivés de la paroi végétale semblent souvent moins bien définis et aucune structure « optimale » ne peut être identifiée. En fait, la relation « structure-activité » des OGA dépend surtout de l'espèce végétale considérée et de la réponse de défense étudiée.

Un des facteurs les plus importants dans la structure des OGA est leur degré de polymérisation (DP). En effet, il a été montré que les réponses biologiques les plus importantes s'observaient pour des OGA ayant un DP compris entre 10 et 16 avec un optimum à 12 (Côté et Hahn, 1994). Ces réponses comprennent entre autre l'induction de phytoalexines, la synthèse de casbéne synthase et l'induction de la phénylalanine amonia lyase (PAL) dans une culture en suspension de cellules de carotte (Messiaen et Van Cutsem, 1994).

La taille minimum des OGA requise pour déclencher une réponse de défense chez la plante, et la taille minimum requise pour induire une conformation « egg-box » calcium dépendante (figure 7), coïncident avec un DP supérieure ou égale à 9 (Messiaen et Van Cutsem, 1994). Ce chiffre avait déjà été avancé deux années plus tôt par Liners et ses collaborateurs (1992) qui ont montré qu'un DP de 9 pouvait encore induire une conformation en « egg-box ». Une concentration en Ca^{2+} de l'ordre du millimolaire est également requise afin de déclencher toute activité biologique chez des cellules en suspension de carotte et de tabac, ce qui montre qu'une conformation dépendante du Ca^{2+} des OGA de $\text{DP} \geq 9$ est requise afin d'induire une activité biologique dans certains essais (Messiaen et Van Cutsem, 1994).

Plusieurs autres études ont montré que des OGA avec un DP autre que celui compris entre 10 et 16 peuvent être biologiquement actifs (Côté et Hahn, 1994). Par exemple, des OGA avec un DP compris entre 2 et 30 élicitent l'expression d'inhibiteurs de protéinases dans des graines de tomates (Farmer *et al.*, 1990), le disaccharide étant le plus actif. Un autre exemple est celui d'OGA ayant un DP compris entre deux et cinq. Ces derniers, et particulièrement les pentasaccharides, ont en effet la capacité d'induire la biosynthèse d'éthylène chez la tomate (Simpson *et al.*, 1998).

4.3. Perception des éliciteurs

Une perception appropriée de l'agresseur pathogène est absolument requise pour que les réponses de défense développées par la plante soient efficaces. Ceci est valable aussi bien pour la perception d'éliciteurs race-spécifiques que pour celle d'éliciteurs généraux.

La reconnaissance par la plante d'un pathogène est souvent déterminée par la reconnaissance du produit du gène d'avirulence (Avr) du pathogène, par le produit d'un gène de résistance (R) de la plante (concept du « gène pour gène »). L'activation des réponses de défense implique donc l'interaction d'une paire assortie d'un gène Avr du pathogène et d'un gène R de la plante.

La reconnaissance des produits des gènes Avr fongiques semble transmise par des récepteurs de la membrane plasmique, alors que les éliciteurs viraux ou bactériens sont perçus

au niveau intracellulaire par des récepteurs solubles, ces récepteurs membranaires ou cytosoliques étant les produits des gènes *R* végétaux (figure 8). La plupart des gènes *R* isolés possèdent des motifs structuraux communs comme des domaines transmembranaires (TM), des sites de fixation nucléotidique (NBS) et des "Leucine Rich Repeats" ou "LRR", qui sont des répétitions imparfaites d'environ 25 acides aminés de type leucine. Ces LRR interviendraient d'une façon générale dans les interactions protéine-protéine et en particulier dans la fixation du ligand dans les protéines de transduction de signaux eucaryotes. Les produits des gènes *R* comportant des LRR, mais pas de TM pourraient être des récepteurs intracellulaires solubles. A l'opposé, les produits des gènes *R* ayant des LRR et des TM, comme les protéines Cf de la tomate ou Xa21 du riz, devraient être des récepteurs membranaires. La protéine Xa21 combine ce domaine LRR extracellulaire N-terminal avec un domaine C-terminal ser/thr kinase intracellulaire séparé par un motif transmembranaire, possédant ainsi les caractéristiques d'un vrai récepteur avec un site de réception pour un stimulus et une région capable d'assurer la transmission du signal en aval. D'autres protéines possèdent, en plus des domaines NBS et LRR, un domaine de type Leucine-zipper (LZ) ou TIR, ce dernier domaine présentant des homologies avec la protéine Toll de la drosophile et le récepteur de l'interleukine-1 des mammifères.

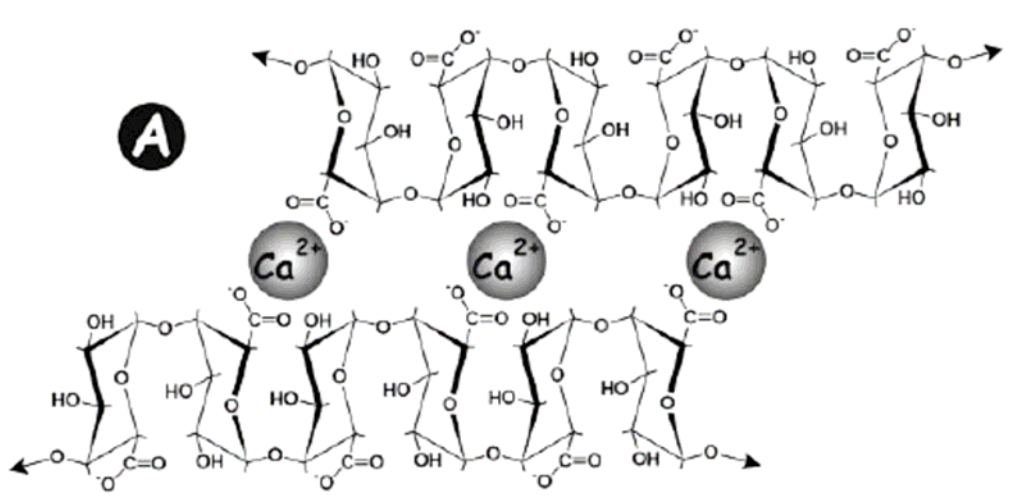


Figure 7. Représentation de l'interaction entre deux molécules de pectine suivant le modèle « egg-box ». Cette interaction se fait par l'insertion d'ions Ca^{2+} entre les groupements carboxyliques des acides galacturoniques des deux chaînes d'homopolysaccharides (Vincken *et al.*, 2003).

En ce qui concerne les fragments pectiques et plus particulièrement les oligosaccharides pariétaux, aucun récepteur au sens strict du terme n'a été identifié jusqu'à présent. Cependant, Reymond et ses collaborateurs (1996) ont caractérisé une phosphoprotéine membranaire de 34 kilodalton (kd), la remorine, capable de lier des OGA d'un DP compris entre 13 et 30 et d'être phosphorylée en leur présence (Reymond *et al.*, 1996).

Des protéines capables de lier des oligogalacturonides sous une conformation « egg-box » calcium dépendante ont été identifiées. Ce sont des isoperoxydases qui se lient au domaine homopolysaccharidique de la pectine. Une telle interaction a en effet été démontrée chez la courgette (Penel *et al.*, 1999).

Une autre famille de protéines, les WAKs (Wall Associated Kinase), est également connue pour être physiquement liée à la matrice extracellulaire et au cytoplasme et servir ainsi

de molécule signal entre ces deux compartiments (He *et al.*, 1996). De plus He et ses collaborateurs (1998) ont montré que les protéines WAK étaient impliquées dans la défense contre les pathogènes. En effet, l'induction de WAK 1 est requise à la plante pour survivre à une infection par *Pseudomonas syringae* (He *et al.* ; 1998). Il a été démontré que WAK 1, un des membres de cette famille, se liait de façon covalente à la pectine (Wagner et Kohorn, 2001). Cependant une étude plus récente a montré qu'il existait plutôt un lien non-covalent entre WAK1 et la pectine pariétale (Decreux and Messiaen, 2005).

4.4. Réponses membranaires et cytosoliques

La stimulation de cellules végétales par des OGA provoque de multiples réponses membranaires et cytosoliques : efflux de potassium, influx de calcium, mobilisation du calcium cytosolique, dépolarisation membranaire, alcalinisation du milieu environnant et enfin acidification cytoplasmique (Mathieu *et al.*, 1991 ; Messiaen et Van Cutsem, 1994).

Ces réponses sont relativement rapides : la dépolarisation membranaire est observée 3 à 5 minutes après la stimulation (Mathieu *et al.*, 1991), l'augmentation de la concentration en calcium est significative 5 min après stimulation (Messiaen et VanCutsem, 1994), et le pH cytosolique est minimal 25 minutes après élicitation (Messiaen et VanCutsem, 1994).

L'ensemble de ces événements membranaires et cytosoliques va contribuer à déclencher les diverses réponses de défense que la plante va mettre en jeu afin de se protéger contre l'attaque pathogène dont elle est l'objet.

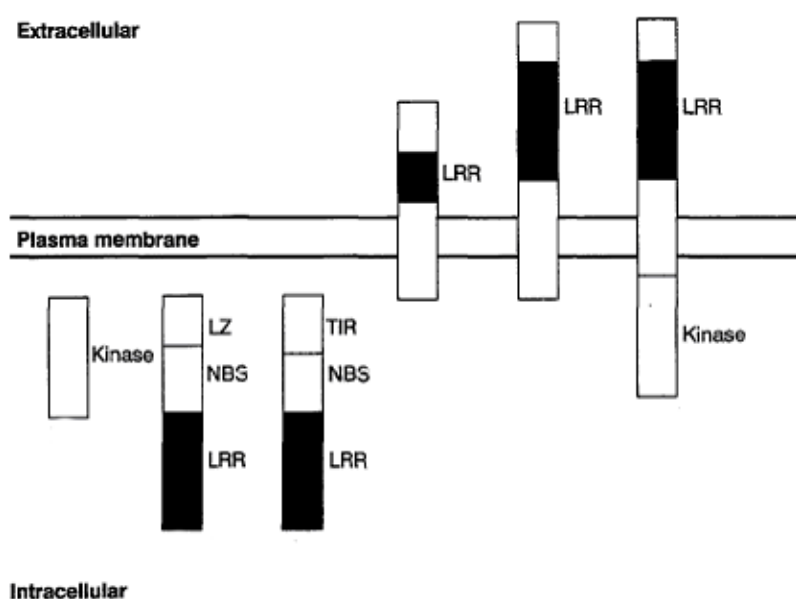


Figure 8. Représentation schématique de la disposition cellulaire et de la composition en domaine d'un certain nombre de produits de gènes de résistance (R). L'extrémité N terminale se situe au sommet de chaque rectangle. LRR, répétition riche en leucine ; LZ, tirette à leucine ; NBS, site de fixation nucléotidique ; TIR, récepteur ressemblant à des récepteurs Toll et à des récepteurs à interleukines.

5. Mécanismes de résistance

5.1. Modification des propriétés physiques de la cellule

La composante structurelle ou morphologique de la réponse de défense de la plante à une agression pathogène est particulièrement importante. En effet, la plante ne possède ni cellules mobiles, ni système circulatoire fermé, composants indispensables à l'établissement d'un système immunitaire tel que celui des vertébrés. De ce fait, le végétal construit une barrière physique dont une des fonctions est d'isoler le pathogène et de l'empêcher d'accéder aux nutriments essentiels à sa croissance.

L'épaississement localisé de la paroi cellulaire végétale au niveau du site de pénétration d'un champignon pathogène est un phénomène connu depuis plus d'une centaine d'année comme étant un processus résultant d'une interaction plante – pathogène). Cette apposition pariétale appelée également papille, est corrélée avec un arrêt de la croissance et de la progression du pathogène fongique à travers la paroi végétale.

Bien que la structure et la composition chimique des papilles présentent une variabilité importante, elles sont généralement composées de callose, un polymère de D-glucose en liaison β -1,3- dont la synthèse est assurée par une enzyme se trouvant à la surface de la membrane plasmique : la callose syntase. Outre la callose, on retrouve également dans ces papilles, de nombreux composés phénoliques de natures fort divergentes.

Parmi les autres composants des papilles, on retrouve de la lignine, une molécule très complexe synthétisée à partir d'alcools cinnamyl methoxylés et hydroxylés, de la cellulose, de la pectine, de la subérine, de la chitine, des lipides, de la silice (Kauss *et al.*, 2003), mais aussi de nombreuses protéines pariétales telles que les glycoprotéines riches en hydroxyprolines (HRGP), riches en proline (PRP) et enfin riches en glycine (GRP).

La synthèse, le dépôt et l'assemblage de tous ces constituants sont apparemment accompagnés d'une production localisée d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS (Reactive Oxygen Species) incluant le peroxyde d'hydrogène.

5.2. Phytoalexines

De nombreux mécanismes de défense des plantes à l'encontre de microorganismes pathogènes impliquent la production de métabolites secondaires. Ces derniers peuvent être constitutifs ou inductibles. Le terme « phytoanticipine » fut proposé afin de distinguer les composés antimicrobiens préformés des phytoalexines induites (Van Etten *et al.*, 1989). Certains métabolites secondaires tels que des glycosides cyanogéniques, glucosinolates et certaines saponines sont stockés dans les cellules végétales sous forme de précurseurs inactifs, mais sont rapidement convertis en antibiotiques activés par les enzymes de la plante suite à une attaque pathogène.

Les phytoalexines, découvertes par Müller et Börger en 1940 lors d'une étude visant à caractériser l'interaction entre *Phytophthora infestans* et *Solanum tuberosum*, sont un groupe de molécules structurellement diverses, généralement lipophiles, non spécifiques dans leur activité antimicrobienne et relativement puissantes (Smith, 1996). L'induction de phytoalexines met en jeu différentes voies de biosynthèse comme la voie des phénylpropanoïdes (figure 9) dont l'enzyme clef est la phénylalanine ammonia-lyase (PAL). Ce phénomène se déroule en quelques heures après l'élicitation et la production de phytoalexines atteint un maximum deux à trois jours après induction.

Harborne a publié en 1999 un article de revue complet dans lequel il recense les diverses phytoalexines découvertes à ce jour (Harborne, 1999). Il passe ainsi en revue les multiples phytoalexines produites par les gymnospermes, par les différentes familles de monocotylédones et de dicotylédones. Il en ressort également que chaque espèce possède ses phytoalexines particulières : la pisatine chez le pois, la phaséoline chez le haricot, la glycéoline chez le soja, ... etc. En résumé, près de 300 structures ont été caractérisées comme étant des phytoalexines dans 900 espèces végétales réparties en 40 familles différentes.

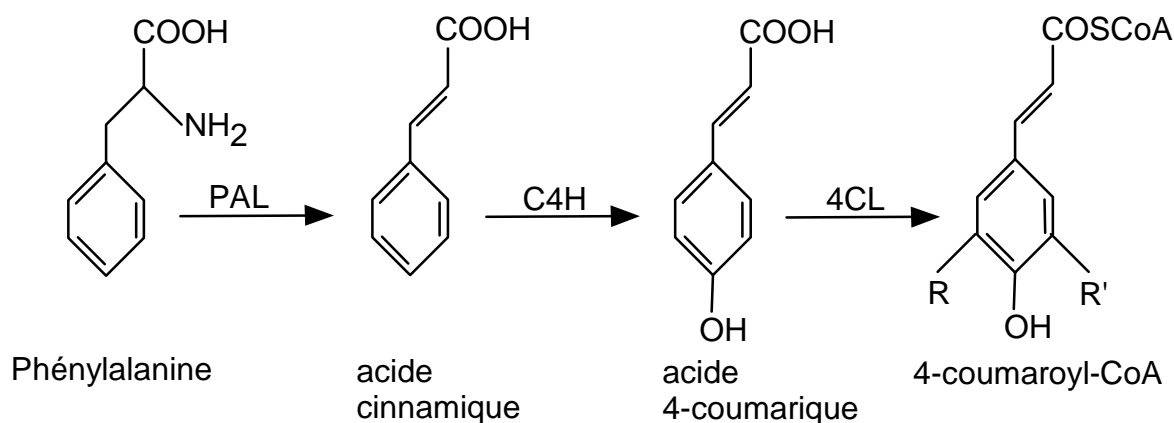


Figure 9. Voie générale des phénylpropanoïdes : La phénylalanine est transformée en coumaryl-CoA via l'action de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), la cinnamate 4-hydroxylase (C4H) et la 4-coumarate-CoA ligase (4CL). Le coumaroyl-CoA servira de précurseur à la synthèse de phytoalexines, de subérine, de lignine et d'autres composés phénoliques liés ou non à la paroi cellulaire végétale.

5.3. Protéines liées à la résistance

De nombreuses protéines semblent être intimement associées à la résistance de la plante contre toute une série de pathogènes. Leurs voies de synthèse sont en effet induites suite à la perception par la cellule végétale d'un signal de danger en provenance du milieu extérieur. Parmi ces protéines, on peut retrouver des protéines liées à la pathogenèse ou protéines PR, des enzymes hydrolytiques, des inhibiteurs de polygalacturonases (PGIP), des protéines antivirales ou encore antifongiques.

5.3.1. Protéines liées à la pathogenèse

D'abord découvertes dans des feuilles de tabac infectées par le virus de la mosaïque du tabac ou TMV (Van Loon and Van Kammen, 1970), les protéines PR (pathogenesis related) se définissent comme des protéines encodées par la plante hôte mais spécifiquement induites dans une situation pathologique ou apparentée telle qu'une infection par un pathogène (viral, viroïde, bactérien ou fongique), une infection parasitaire, par des produits de dégradation en provenance de la paroi fongique ou de la paroi de la cellule hôte, par des enzymes pectolytiques ou encore par des piqûres d'insectes.

A l'origine, cinq grandes classes de protéines PR (PR- 1 à 5) furent caractérisées chez le tabac à la fois biochimiquement et selon des techniques de biologie moléculaire (Kombrink and Somssich, 1997). Par la suite, 11 familles (PR- 1 à 11) furent identifiées et classifiées chez le tabac et la tomate. Les critères utilisés pour l'inclusion d'une nouvelle famille dans la famille des protéines PR sont que (i) les protéines doivent être induites par un pathogène dans un ou des tissus qui ne les expriment pas en temps normal, et (ii) qu'une telle induction doit avoir été démontrée dans au moins deux combinaisons différentes « plante – pathogène » ou

alors que l'expression de ces protéines pour une seule combinaison « plante – pathogène » soit confirmée indépendamment dans différents laboratoires (Van Loon and Van Strien, 1999). Afin de caractériser et de nommer un membre d'une des familles de protéines PR, il est bien entendu nécessaire de connaître la séquence en acides aminés de cette protéine ainsi que des informations sur son activité protéique.

Actuellement, 17 familles de protéines PR sont recensées à travers la littérature (PR-1 à 17). Pour la majorité de ces familles, l'activité est bien connue ou peut être inférée par homologie (Kombrink et Somssich, 1997 ; Linthorst, 1991). Ainsi, la famille **PR-2** est composée d'endo- β -1,3-glucanases, tandis que les familles **PR-3**, **-4**, **-8** et **-11** sont toutes classées comme étant des endochitinases. Ces diverses chitinases peuvent être différenciées en classes avec par exemple la classe III (PR-8) qui possède une activité lysozyme. La famille **PR-6** regroupe des inhibiteurs de protéinases impliqués dans la défense contre les insectes, les micro-organismes et les nématodes (Ryan, 1990). Les **PR-7**, très bien caractérisées chez la tomate, possèdent une activité endoprotéinase. En effet, la lyse des parois fongiques requiert bien souvent la dégradation des protéines pariétales du pathogène, en plus de l'hydrolyse de la chitine et des glucanes. La famille **PR-9** est quant à elle composée de peroxydases ayant notamment pour fonction de renforcer la paroi cellulaire en catalysant le dépôt de lignine suite à une attaque pathogène. Les protéines **PR-5** appartiennent aux protéines thaumatine-like possédant une homologie avec les permattines, connues pour perméabiliser les parois fongiques (Vigers *et al.*, 1991). Les membres de la famille **PR-10** sont structurellement apparentées à des ribonucléases (Moiseyev *et al.*, 1997). Ces protéines pourraient avoir un rôle prépondérant dans la lutte antivirale. Les protéines **PR-12** de type défensines, **PR-13** de type thionines (Bohlmann, 1994) et **PR-14** de type transporteurs de lipides (Lipid-transfer proteins ou LTPs) (Blein *et al.*, 2002) possèdent toutes une activité antifongique et antimicrobienne. Les protéines **PR-1** possèdent également une activité antifongique mais leur mode d'action n'est pas encore élucidé. Les familles **PR-15** et **PR-16** regroupent respectivement des oxalates oxydases (Zhang *et al.*, 1995) et des oxalates oxydases-like (Wei *et al.*, 1998). Ces enzymes sont connues pour générer du peroxyde d'hydrogène. Enfin, le travail réalisé par Christensen et ses collaborateurs (Christensen *et al.*, 2002) a permis de mettre en exergue une nouvelle famille de protéines PR. Cette famille, appelée **PR-17** regrouperait des protéines possédant une similarité avec des aminopeptidases-N-eucaryotiques et des endopeptidases bactériennes de type thermolysine.

5.3.2. Protéines inhibitrices de polygalacturonases (PGIP)

Une interaction plante-pathogène et particulièrement une interaction « plante-champignon » peut être assimilée à un véritable bras de fer (figure 10) Nous venons de voir que la plante allait produire une série d'enzymes hydrolytiques dans le but de s'attaquer aux constituants pariétaux du pathogène. En réponse, l'envahisseur va riposter en produisant des protéines inhibitrices de glucanases (GIP) et une série d'enzymes telles que des polygalacturonases, des pectines et pectates lyases et des pectines estérases qui vont s'attaquer aux pectines de la paroi cellulaire végétale. En parade à cette nouvelle offensive du pathogène, la plante va fabriquer des inhibiteurs de polygalacturonases qui vont non seulement ralentir l'action destructrice des polygalacturonases mais aussi permettre la production de fragments oligogalacturonides de taille plus grande. Ces fragments, d'origine végétale (éliciteurs « endogènes ») sont des signaux que la plante sait percevoir afin d'amplifier ses réponses de défense. Cette amplification est renforcée par la capacité des cellules végétales à percevoir également des oligomères de chitine et de glucanes, des éliciteurs exogènes qui résultent de l'attaque des parois fongiques par les chitinases et glucanases végétales.

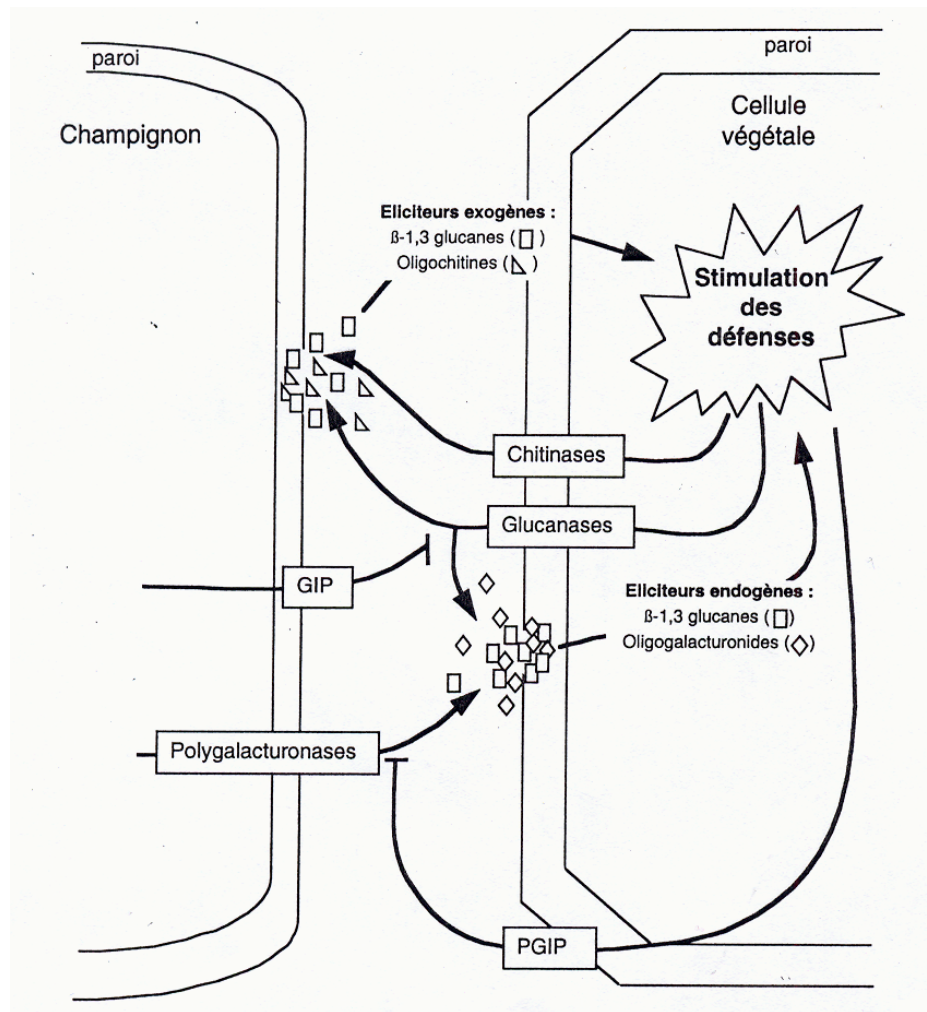


Figure 10. Illustration témoignant du véritable « bras de fer » auquel se livrent la plante et un pathogène fongique. La plante va produire une série d'enzymes hydrolytiques dans le but de s'attaquer aux constituants pariétaux du pathogène. En réponse, l'envahisseur va riposter en produisant des protéines inhibitrices de glucanases (GIP) et une série d'enzymes telles que des polygalacturonases, des pectines et pectates lyases et des pectines estérases qui vont s'attaquer aux pectines de la paroi cellulaire végétale. En parade à cette nouvelle offensive du pathogène, la plante va fabriquer des inhibiteurs de polygalacturonases (PGIP) qui vont non seulement ralentir l'action destructrice des polygalacturonases mais aussi permettre la production de fragments oligogalacturonides de taille plus grande. Ces fragments, d'origine végétale (éliciteurs « endogène ») sont des signaux que la plante sait percevoir afin d'amplifier ses réponses de défense. Cette amplification est renforcée par la capacité des cellules végétales à percevoir également des oligomères de chitine et de glucanes, des éliciteurs exogènes qui résultent de l'attaque des parois fongiques par les chitinases et glucanases végétales.

5.3.3. Protéines antivirales

Outre les protéines PR, d'autres molécules de nature protéique sont associées au développement d'une défense antivirale et protègent donc la cellule végétale contre une attaque virale. Ces protéines appelées également facteurs antiviraux (AVF) ont été découvertes lors de l'étude de l'interaction entre des feuilles de tabac hypersensibles et le virus de la mosaïque du tabac (TMV). Ce sont des glycoprotéines solubles ayant un poids moléculaire avoisinant les 22 KDa et non spécifiques du virus ni de son hôte. L'induction de ces facteurs antiviraux ou leur activation peut se réaliser par des ARN bicaténaires (spécifiques du monde viral) et des polynucléotides de synthèse.

5.3.4. Protéines antifongiques

Des graines et des tubercules peuvent contenir des protéines antifongiques constitutives. Ces protéines antifongiques incluent des glycosidases, les thionines (isolées de graines de blé et d'orge), les permatines (isolée de graines de nombreuses espèces végétales) et des protéines inactivant les ribosomes (ou protéines RIP pour *Ribosome Inactivating Protein*). Ces protéines RIP inhibent les ribosomes des espèces éloignées (dont les ribosomes fongiques) en modifiant leurs ARNr 28S.

5.4. Espèces réactives de l'oxygène et réponse hypersensible

5.4.1. Espèces réactives de l'oxygène

Les plantes, comme bien d'autres organismes, utilisent l'oxygène atmosphérique comme accepteur final des électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale. Au cours de la réduction de l'O₂ en H₂O, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites. Parmi celles-ci, on retrouve le radical hydroxyl (OH[•]), l'anion superoxyde (O₂^{•-}), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ainsi que de l'oxygène à l'état singulet (¹O₂). Il est intéressant de noter que la plante peut également produire des espèces réactives du soufre, de l'azote, tel que l'oxyde nitrique (NO), et des peroxydes lipidiques.

De nombreux stress abiotiques et biotiques ont la capacité de déclencher une augmentation rapide et éphémère de la production de ces ROS et particulièrement de O₂^{•-} et d'H₂O₂. Ce phénomène est communément appelé « choc oxydatif » et est caractérisé par une cinétique biphasique (Lamb and Dixon 1997) comprenant un premier pic une à deux heures après infection, suivi d'un second pic de magnitude plus importante trois à six heures après infection. Cette seconde phase déclenchée par un pathogène avirulent, aboutit à une mort cellulaire localisée appelée aussi réponse hypersensible (Lamb and Dixon, 1997 ; Scheel, 2002).

Un tel choc oxydatif biphasique est également induit en réponse à une grande variété de stress abiotiques incluant des températures extrêmes, une luminosité intense, un déficit en eau, des herbicides, le cycloheximide, des amines et certains polluants atmosphériques tels que l'ozone, le SO₂ ou encore le NO₂ (Tenhaken and Rubel 1998, Scheel, 2002).

La plupart des compartiments cellulaires ont la capacité de produire des ROS. Ces formes réactives de l'oxygène peuvent en effet être générées par diverses oxydases et peroxydases en provenance des mitochondries, des chloroplastes, des peroxysomes et du noyau (Allan and Fluhr 1997, Bolwell and Wojtaszek 1997, del Rio *et al.* 2002, Scheel, 2002). Les mécanismes de détoxification catalysés par les cytochromes et en particulier le cytochrome P₄₅₀ dans le cytoplasme et le réticulum endoplasmique, sont une autre source

importante de production de ROS (Urban *et al.* 1997). Ces ROS sont également générés au niveau du plasmalemme via une NADPH oxydase membranaire analogue à celle des neutrophiles des cellules mammaliennes (Bolwell *et al.* 2002). Enfin, de nombreuses peroxydases et amines oxydases en provenance de la paroi végétale contribuent également à la production de ces ROS. Signalons encore que la plante produit du NO, une espèce réactive de l'azote (RNS) qui peut interagir avec les ROS pour former un anion hautement réactif : le peroxynitrite (ONOO).

Les ROS peuvent agir directement contre les attaques des phytopathogènes en tuant les micro-organismes et agiraient donc tel un antibiotique. La présence à la fois de H₂O₂ et d'O₂⁻, ou encore la réaction de l'H₂O₂ avec des métaux de transition appelée « réaction de Fenton » (figure 11) conduisent à la formation d'une forme extrêmement réactive de l'oxygène, le radical hydroxy dont les effets dévastateurs sur les microorganismes sont bien connus. De plus, la présence d'H₂O₂ peut également entraver la pénétration des pathogènes dans les différents tissus végétaux. En effet, le peroxyde d'hydrogène contribue à renforcer la paroi végétale en favorisant la réticulation via des peroxydases de certains composants structurels de la paroi dont des protéines pariétales riches en résidus tyrosine entre elles et avec la paroi elle-même (Brady *et al.* 1996, 1997). L'H₂O₂ peut également induire le pontage entre ces résidus tyrosine et les chaînes aromatiques de la lignine (Ros Barcello, 1997). Le peroxyde d'hydrogène étant une molécule diffusible à travers les membranes biologiques, il peut agir comme signal intracellulaire capable d'activer des réponses de défense telles que la synthèse de phytoalexines (Doke *et al.*, 1994) via l'accumulation d'ARNm de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), de la chalcone synthase et de la chalcone isomérase qui sont des enzymes impliquées dans les voies de biosynthèses des phytoalexines. Enfin, d'autres gènes impliqués dans la défense cellulaire sont également induits par l'H₂O₂. Ces gènes encodent pour la glutathione S-transférase, la glutathione peroxydase et une polyubiquitine.

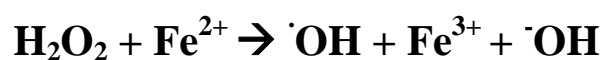


Figure 11. Réaction de Fenton

Face à ces molécules de défense limitant l'attaque pathogène, mais néanmoins toxiques, la plante possède des mécanismes de détoxification lui permettant d'éliminer ces ROS. Ainsi, la superoxy dismutase (SOD) catalyse la dismutation de l'O₂⁻ en H₂O₂, la catalase (CAT) dismute l'H₂O₂ en oxygène moléculaire et en eau, et l'ascorbate peroxydase (APX) réduit l'H₂O₂ en eau par le biais de l'ascorbate (ASC), un donneur d'électron spécifique. Le végétal peut ainsi produire des molécules réactives tout en protégeant sa propre intégrité cellulaire par l'action des différentes enzymes susmentionnées.

5.4.2. La réaction hypersensible

L'ensemble des réactions de défense décrites ci-dessus se mettent en place plus ou moins simultanément à proximité du site d'infection. Cette réponse locale est caractérisée par une nécrose tissulaire ou réaction hypersensible. Cette mort cellulaire concerne les cellules qui ont été en contact avec l'agent pathogène. Ces cellules ont modifié leur paroi de telle manière à s'isoler de l'ensemble des cellules non infectées. Elles accumulent de grandes quantités de phytoalexines, de protéines PR et subissent un choc oxydatif libérant des espèces réactives de l'oxygène.

La signification physiologique de l'isolement cellulaire et de l'apoptose cellulaire est de constituer une barrière physico-chimique importante et de ralentir, voire arrêter, la progression de l'agent pathogène. Ces cellules infectées ne sont cependant pas mortes pour rien puisqu'elles ont eu le temps d'émettre des molécules-signal (acide salicylique, méthylejasmonate,...) vers les cellules voisines non infectées par le pathogène. Ces cellules peuvent, à leur tour, envoyer des signaux à des tissus ou organes situés très loin du site d'infection. La plante acquiert ainsi un arsenal de défense préventif systémique : c'est la résistance systémique acquise (SAR). Ce mécanisme reste cependant non spécifique car il est à la fois opérationnel contre le pathogène qui attaque la plante mais également contre des pathogènes que la plante n'a jamais rencontrés.

6. Les méthodes d'analyse du transcriptome

Les réponses de défense de la plante vis-à-vis d'un agent pathogène sont donc, comme nous venons de le voir, multiples et complexes. De plus les mécanismes mis en œuvre suite au contact avec l'envahisseur peuvent se recouvrir et même posséder des voies d'induction communes. Afin d'étudier ces réponses à un niveau transcriptionnel, plusieurs outils existent. Ce chapitre va passer en revue les principales techniques d'analyse différentielle du transcriptome permettant d'apporter des informations sur ces mécanismes de défense.

Ces dernières années, de nombreuses méthodes d'analyse du transcriptome ont été développées. Ces méthodes permettent, soit de trouver des séquences liées à une condition physiologique particulière (gène différentiellement exprimés), soit d'analyser de façon exhaustive l'ensemble du génome dans des conditions définies au préalable par l'expérimentateur. Les paragraphes suivants proposent une description de ces principales techniques d'analyse et de leur application dans le domaine végétal.

6.1. Méthodes d'analyse basées sur l'amplification PCR et le séquençage

6.1.1. Le DD-RT-PCR ou Differential Display

Le *differential display* (Liang et Pardee, 1992) peut être considéré comme une technique dérivée des marqueurs RAPD, appliquée aux ADNc. Lorsque cette technique fut publiée pour la première fois en 1992, elle fut présentée comme étant une méthode rapide et fiable pour comparer l'expression des gènes de deux ou plusieurs populations cellulaires. Le principe de cette méthode est relativement simple (figure 12). L'ARN total extrait des cellules est dans un premier temps rétrotranscrit par l'utilisation d'une amorce de type $T_{11}XY$ ($X = A, C, G$; $Y = A, C, G, T$) qui servira également de matrice pour la PCR suivante. Une PCR est ensuite réalisée en utilisant des nucléotides marqués radioactivement, l'amorce $T_{11}XY$ et un pool d'amorces longues de dix nucléotides (décamères) aléatoirement choisis. Chacune de ces amorces amplifiera une partie de tous les ADNc et, dans chaque tube PCR, seront présents une centaine de fragments d'ADNc. Une fraction de ce produit PCR est ensuite séparée par électrophorèse et le profil des ADNc amplifiés est révélé par autoradiographie. La comparaison entre deux populations distinctes d'ADNc peut faire apparaître des différences dans les profils d'amplification. Ces bandes différentiellement amplifiées correspondent potentiellement à des gènes dont l'expression est modifiée entre les deux échantillons. Ces bandes d'intérêt sont alors excisées du gel, réamplifiées, clonées et enfin séquencées.

L'avantage le plus significatif de cette technique est sans aucun doute la simplicité de la méthode et la possibilité de détecter virtuellement tous les ARNm exprimés par l'utilisation d'un nombre suffisant de combinaisons d'amorces (Kozian et Kirschbaum, 1999). Un autre avantage du *differential display* est qu'il permet l'identification des gènes différentiellement exprimés sans aucun *a priori* sur leur nature. Cependant, cette méthode étant basée sur une amplification PCR, elle ne permet donc d'identifier que des différences qualitatives de profils d'expression et est inappropriée pour détecter des variations de taux d'expression. Par dessus tout, cette technique engendre une forte proportion de faux positifs dans les gènes initialement identifiés (jusqu'à 30%).

Dans le domaine végétal, cette technique a notamment été utilisée afin de caractériser l'induction de la méthionine synthase lors d'un stress salin dans des feuilles d'orge (Narita *et*

al., 2004) ou encore pour isoler les gènes induits chez *Prunus armeniaca* suite à une infection par un phytoplasme (Carginale *et al.*, 2004).

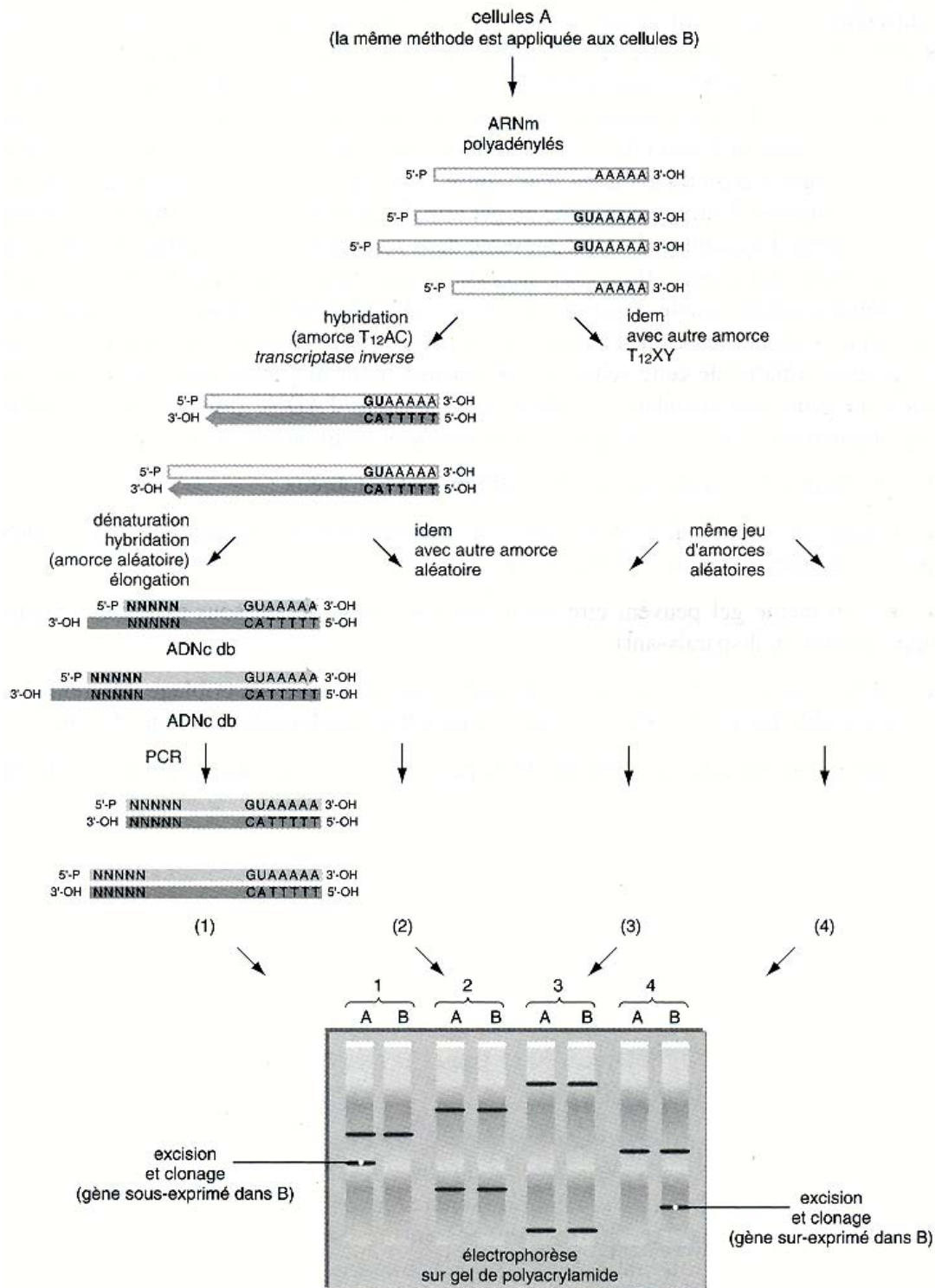


Figure 12. Schéma de principe du DD-RT-PCR.

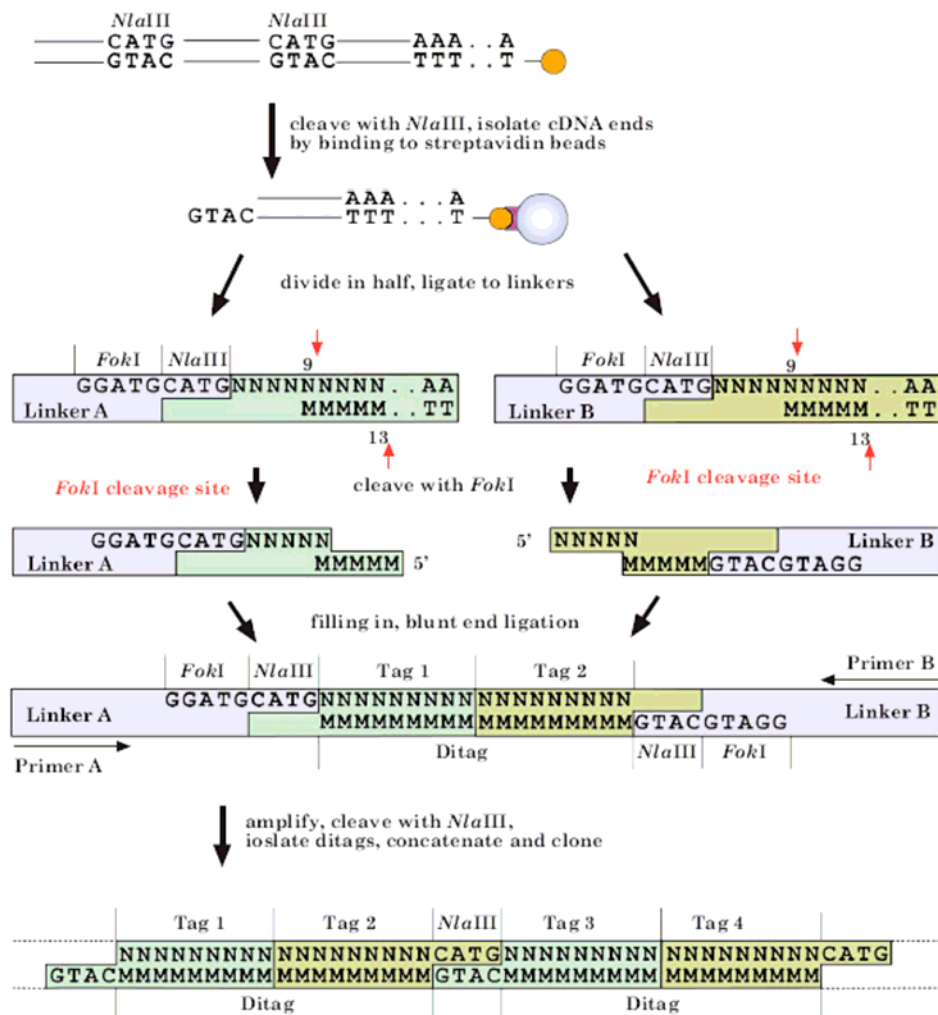


Figure 13. Principe de base du SAGE. L'ADN double brin est synthétisé à partir d'ARNm via une amorce oligo(dT) biotinylée. L'ADN est ensuite digéré par *NlaIII*, une enzyme de restriction reconnaissant une séquence de 4 pb et coupant donc fréquemment. Les extrémités 3' biotinylées des fragments ainsi générés sont isolées par liaison à la streptavidine. Les fragments isolés sont ensuite divisés en deux groupes et chaque moitié est liguée par son extrémité 3' cohésive à un des deux adaptateurs contenant un site de reconnaissance *FokI*. *FokI* est une enzyme de restriction de type II S. Ces enzymes clivent à une certaine distance du site de reconnaissance asymétrique. La restriction du produit de ligation via *FokI* provoque la libération d'un segment composé de l'adaptateur et d'un court fragment de l'ADNc appelé « tag ». Les extrémités cohésives sont remplies, et les deux groupes de tags libérés sont liés les uns aux autres. Ces tags liés ensemble servent ensuite de matrice pour une amplification PCR avec des amorces spécifiques de chaque adaptateur. L'amplicon résultant contient deux tags (un « ditag ») liés queue à queue et flanqués par un site de restriction *NlaIII* et une séquence de l'adaptateur à chaque extrémité. La restriction du produit PCR avec *NlaIII* permet d'isoler les ditags qui sont ensuite concaténés, insérés dans un vecteur et clonés. Les clones contenant jusqu'à 50 ditags sont ensuite amplifiés par PCR et séquencés. Dans la séquence, les ditags sont comptés facilement car ils sont séparés chacun par un site *NlaIII* qui sert ainsi de balise. La fréquence de chaque tag dans une banque SAGE reflète directement l'abondance des ARNm correspondant dans le tissu ou la cellule étudiés.

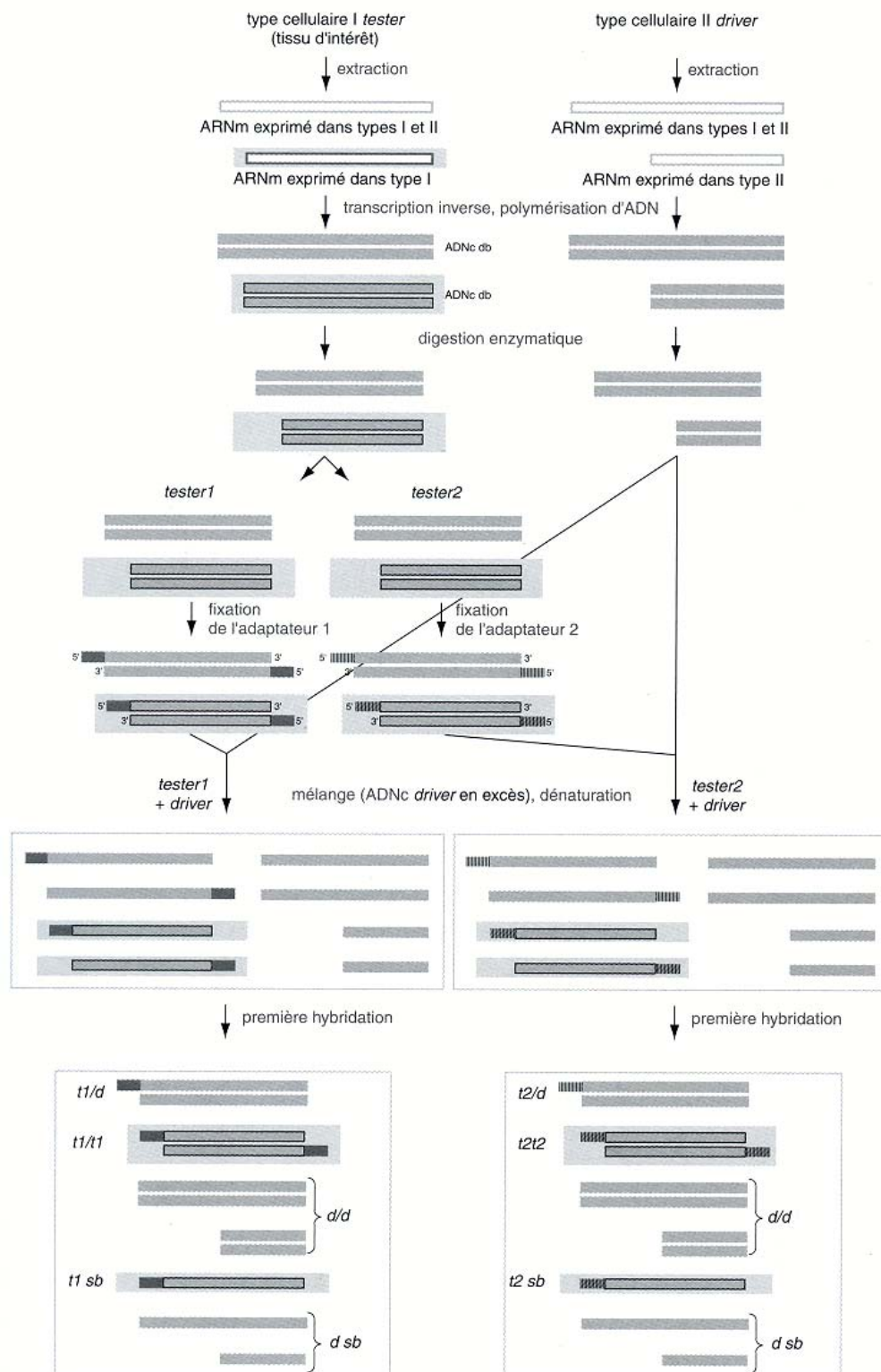


Figure 14. Schéma de principe de l'hybridation suppressive soustractive (HSS). L'objectif de cette technique est de supprimer les ARNm communs à deux échantillons afin de créer des sous-populations simplifiées ne contenant que les ARNm exprimés différemment entre les échantillons de départ

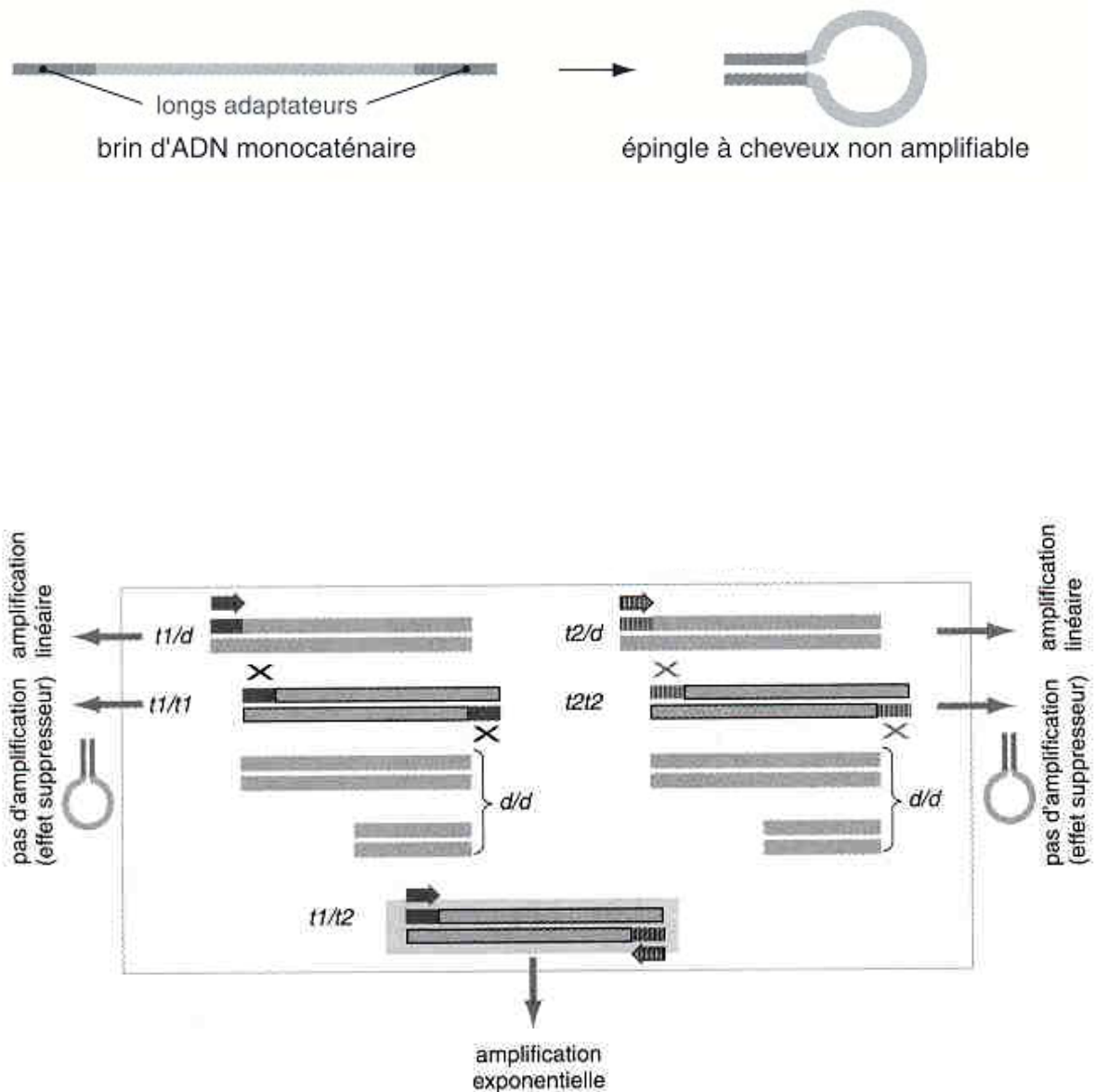


Figure 16. Schéma de principe de l'hybridation suppressive soustractive (HSS) (suite). Les deux lots *tester* 1 et *tester* 2 sont réunis et la réassociation est poursuivie durant 16 à 18 heures souvent en présence d'un nouvel excès de *driver*. Au final, on retrouvera en solution en plus des monohybrides et hétérohybrides précités, des hétérohybrides *tester1/tester2*. Ceux-ci correspondent à des séquences qui sont absentes du *driver* et qui sont de ce fait spécifique du *tester*. Ce sont les séquences cibles de l' HSS. Après remplissage des extrémités 3' en regard des adaptateurs, on utilise, afin de procéder à l'amplification PCR de ces séquences cibles, un couple d'amorces complémentaires des deux types d'adaptateurs utilisés. Les séquences sans adaptateurs ne seront pas amplifiées, les séquences à un seul adaptateur (hétérohybride *tester/driver*) seront amplifiées linéairement, et les séquences possédant un même adaptateur à chacune de leurs extrémités (homohybrides *tester/tester*) tomberont sous l'effet suppresseur de la PCR. Seuls les hétérohybrides *tester1/tester2* seront amplifiés exponentiellement.

6.1.2. Le SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)

La technique SAGE (Velculescu *et al.*, 1995), combine des techniques classiques de biologie moléculaire et conserve l'avantage de ne nécessiter aucun *a priori* sur la nature des gènes analysés. Trois grandes étapes constituent les bases moléculaires du SAGE (figure 13) : (1) l'obtention de séquences dites étiquettes ou « tag » (10 à 14 pb) afin d'identifier les transcrits exprimés ; (2) la ligation de ces séquences « tag » en vue d'obtenir des concatémères qui peuvent être clonés et séquencés ; et (3) la comparaison des séquences afin de déterminer des différences potentielles dans l'expression des gènes ayant été identifiés par des « tags ».

Une étiquette donnée est théoriquement spécifique du messenger dont elle est issue, et le nombre de copies dans la banque séquencée est directement proportionnel à l'abondance relative du messenger dans l'échantillon initialement analysé. L'inconvénient majeur de cette technique est la taille des étiquettes, souvent trop courte pour identifier sans ambiguïté les transcrits (Lee *et al.*, 2002).

Chez les plantes, des profils d'expression ont été recherchés dans différents organes et différentes conditions physiologiques. Par exemple, cette technique a permis d'étudier l'induction de gènes chez le riz par des éliciteurs du pathogène *Magnaporthe grisea* (Matsumura *et al.*, 2003). Chez *Arabidopsis thaliana*, la technique SAGE a été utilisée entre autres afin d'étudier la modulation de l'expression des gènes en réponse au froid (Jung *et al.*, 2003).

6.1.3. L' HSS (Hybridation Suppressive Soustractive)

La méthode HSS (Diatchenko *et al.*, 1996) est une technique de criblage différentiel couplée à la PCR. L'objectif est de supprimer les ARNm communs à deux échantillons afin de créer des sous-populations simplifiées ne contenant que les ARNm exprimés différemment entre les échantillons de départ (figure 14). Cette méthode met en œuvre une étape de normalisation entre les séquences abondantes et celles au contraire très rares. Ceci permet de favoriser la détection des ARNm peu abondants. L'HSS est fondée à la fois sur la cinétique de réassociation des brins d'ADN et sur l'existence de l'effet suppresseur de la PCR. Cet effet est dû au fait que de longs adaptateurs inversés (complémentaires) placés de part et d'autre d'un brin monocaténaire auront plus d'affinité l'un pour l'autre que pour une amorce d'amplification plus courte. Lorsque ces longs adaptateurs inversés se reconnaissent, ils forment des structures en épingle à cheveux non amplifiables. (figure 15)

Comme dans beaucoup de techniques de soustraction, on désigne par le terme de *tester* l'échantillon d'intérêt et par le terme *driver* l'échantillon témoin auquel est comparé le *tester*. Les ARN sont extraits puis rétrotranscrits en ADNc. Les ADNc *tester* et *driver* sont ensuite digérés par une même enzyme de restriction afin d'obtenir des fragments de petite taille plus favorables aux étapes suivantes d'hybridation. Les ADNc *tester* sont divisés en deux pool égaux auxquels sont liés de longs adaptateurs (44pb) différents entre *tester* 1 et *tester* 2. Les trois lots d'ADNc (*driver*, *tester* 1 et *tester* 2) sont dénaturés et les ADNc *driver* sont mélangés en excès à chacun des lots *tester*. Le mélange d'ADNc est laissé à la réassociation. Plusieurs cas de figure apparaissent : on trouvera dans chaque lot des séquences monocaténaires n'ayant pas encore trouvé leur brin complémentaire, des monohybrides *tester/tester* ou *driver/driver* (effet normalisateur de la cinétique d'hybridation) et des hétérohybrides *tester/driver* (effet soustractif de l'hybridation).

Les deux lots *tester* 1 et *tester* 2 sont alors réunis et la réassociation est poursuivie durant 16 à 18 heures souvent en présence d'un nouvel excès de *driver* (figure 16). Au final, on retrouvera en solution en plus des monohybrides et hétérohybrides précités, des

hétérohybrides *tester1/tester2*. Ceux-ci correspondent à des séquences qui sont absentes du *driver* et qui sont de ce fait spécifique du *tester*. Ce sont les séquences cibles de l' HSS.

Après remplissage des extrémités 3' en regard des adaptateurs, on utilise, afin de procéder à l'amplification PCR de ces séquences cibles, un couple d'amorces complémentaires des deux types d'adaptateurs utilisés. Les séquences sans adaptateurs ne seront pas amplifiées, les séquences à un seul adaptateur (hétérohybride *tester/driver*) seront amplifiées linéairement, et les séquences possédant un même adaptateur à chacune de leurs extrémités (homohybrides *tester/tester*) tomberont sous l'effet suppresseur de la PCR. Seuls les hétérohybrides *tester1/tester2* seront amplifiés exponentiellement.

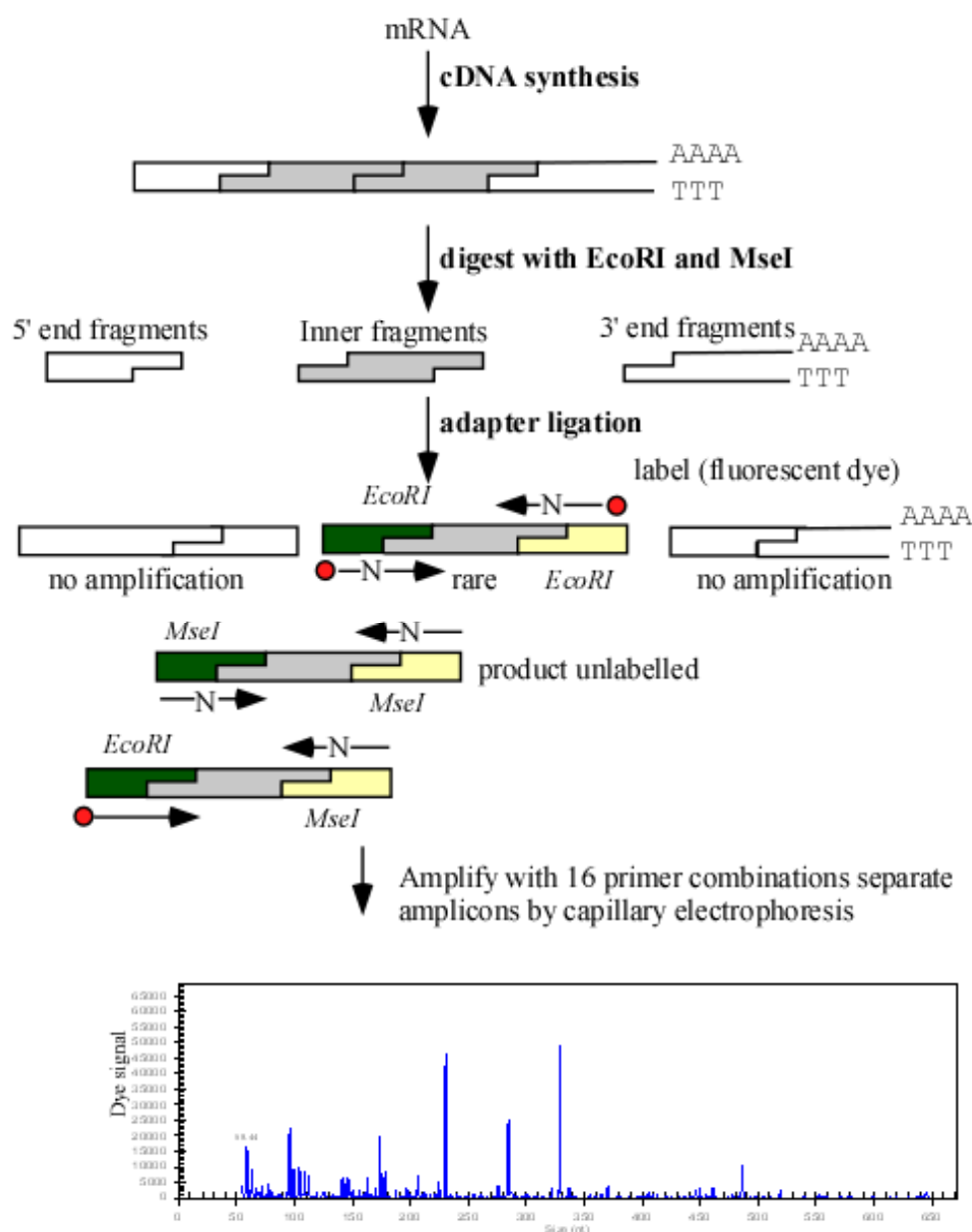


Figure 17. Schéma de principe de l'AFLP-cDNA.. N, nucléotide aléatoire.

L'étape de normalisation permet d'éviter les biais dus aux différences d'abondance des ARNm auxquels la plupart des techniques d'analyse du transcriptome sont sensibles. Le facteur d'enrichissement allant de 1000 à 5000, l'HSS est également une méthode de choix pour rechercher et cloner des séquences rares. Une des limites de cette méthode est certainement la quantité nécessaire du matériel de départ : cette technique demande au moins 1 µg d'ARNm. Enfin, l'étape de restriction des ADNc empêche la caractérisation de séquences d'ADNc entières.

Dans le domaine végétal, de nombreux travaux ont été réalisés sur différents modèles comme le riz (Chen *et al.*, 2002) ou encore *Arabidopsis thaliana* (Hinderhofer et Zentgraf, 2001).

6.1.4. L'AFLP-ADNc

L'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) est une méthode qui a d'abord été utilisée pour la recherche de polymorphisme entre génomes (Vos *et al.*, 1995). Son utilisation sur des ADNc (Bachem *et al.*, 1996) permet d'identifier des gènes différentiellement exprimés. La technique comporte quatre grandes étapes (Bachem *et al.*, 1998) : (1) restriction de l'ADNc et ligation d'adaptateurs oligonucléotidiques ; (2) préamplification des produits de ligation avec des amorces s'hybridant aux adaptateurs ; (3) amplification sélective des produits de préamplification via des amorces PCR portant des nucléotides sélectifs à leur extrémité 3'. Une des deux amorces est porteuse d'une sonde fluorescente ou radioactive. Ceci permet la détection ultérieure des fragments, et (4) analyse des fragments ainsi obtenus par électrophorèse avec détection de la sonde fluorescente fixée aux différents fragments appelés également des TDFs (Transcript-Derived Fragments).

De façon plus détaillée, l'ADNc est synthétisé à partir d'ARN total et digéré par deux enzymes de restriction, par exemple EcoRI et MseI, reconnaissant une séquence de six et quatre paires de bases respectivement. Une digestion complète de l'ADNc de la plante va générer cinq types différents de molécules (figure 17) : des fragments EcoRI/EcoRI, un fragment MseI/MseI, des fragments EcoRI/MseI et deux fragments terminaux avec une seule extrémité cohésive. L'enzyme MseI qui coupe l'ADN fréquemment va générer des fragments d'ADNc relativement courts (256 pb en moyenne). EcoRI, quant à elle, coupe plus rarement car elle reconnaît un site à 6 pb. De ce fait, cette enzyme va réduire le nombre de fragments, rendant ainsi plus facile l'analyse des transcrits. Après cette digestion, des adaptateurs double-brin sont ligués aux produits de restriction. Ces adaptateurs constitueront des matrices pour les amplifications ultérieures. Par la suite, une amplification PCR se réalisera et ce, en deux étapes. Au cours de la première étape, une amplification non spécifique d'une vingtaine de cycles est réalisée avec des amorces sans base supplémentaire à leurs extrémités. Le produit de cette amplification appelée préamplification est sujet à une seconde amplification PCR (amplification dite sélective) utilisant des amorces portant, à leurs extrémités 3', un nucléotide additionnel qui s'étend dans la séquence du produit de restriction-ligation. Ceci va permettre à seulement une sous-population de TDFs d'être amplifiée. Notons également qu'une sonde fluorescente est fixée à l'extrémité 5' de l'amorce reconnaissant l'adaptateur EcoRI. Les amplicons sont ensuite séparés sur gel par électrophorèse capillaire et visualisés par un détecteur de fluorescence à la sortie du capillaire. Les données sont traitées informatiquement et la sortie représente des pics séparés suivant la taille des fragments et dont l'intensité se mesure en unités de fluorescence. La plupart des pics présents sur le chromatogramme représentent les fragments EcoRI/MseI car les fragments EcoRI/EcoRI sont rares (raison pour laquelle la sonde est fixée sur EcoRI) et les fragments MseI/MseI sont invisibles (ils ne portent pas de fluorochrome).

Cette technique va donc permettre, par comparaison des sorties d'un échantillon test et contrôle, de mettre en évidence des pics présents dans une condition et absents dans l'autre.

Une fois ces pics identifiés, le produit d'amplification présélective est réamplifié (Tamborindeguy *et al.*, 2004) avec des amorces non marquées afin d'obtenir des TDF dépourvus de la sonde fluorescente. Le produit PCR est ensuite purifié et une ligation est réalisée dans un vecteur de transformation (PCR II). Après transformation, les bactéries d'intérêt sont criblées via le test « blanc-bleu ». Une dernière amplification à l'aide d'amorces marquées permettra, après passage du produit d'amplification sur analyseur de fragments, de rechercher le ou les pics qui avaient été identifiés comme étant différentiellement présents suivant la condition expérimentale. Un séquençage ultérieur doit permettre d'identifier précisément le gène correspondant.

Cette technique possède l'avantage de ne nécessiter qu'une faible quantité d'ARN de départ, ceci étant dû à l'étape d'amplification présélective réalisée à l'aide d'amorces non sélectives. Vu que des conditions d'hybridation stringentes sont utilisées pour les réactions d'amplification, des événements de mauvais appariements s'observent uniquement dans le cas où le niveau de transcrits est extrêmement élevé. Ceci implique que cette technique est hautement reproductible et ne présente presque pas de faux positifs (comparativement au *différential display*). De plus, la mise en œuvre de cette méthode est relativement simplifiée par l'utilisation de kits. Un des désavantages du AFLP-ADNc est que cette méthode requiert la présence de sites de restrictions appropriés sur les molécules d'ADNc. Plusieurs AFLP-ADNc avec différentes enzymes de restriction sont nécessaires afin de visualiser, avec une grande probabilité, tous les ADNc présents dans une cellule végétale.

Chez les plantes, cette technique a été utilisée afin d'identifier des gènes différentiellement exprimés dans des conditions particulières comme lors d'un stress thermique (Simões-Araújo *et al.*, 2002), un stress salin (Umezawa *et al.*, 2002), une interaction compatible avec un pathogène particulier (Zhang *et al.*, 2003), une réponse hypersensible (Kemp *et al.*, 2005) ou encore afin de mettre en exergue des gènes différentiellement exprimés lors du stade de développement d'un organe particulier tel que celui de la racine de chicorée (Goupil *et al.*, 2003).

6.2. Méthodes d'analyse basées sur l'hybridation : les puces à ADN

6.2.1. Considérations générales

Une puce à ADN, aujourd'hui communément appelée « *DNA microarray* » en anglais, est constituée de fragments d'ADN immobilisés sur un support solide selon une disposition ordonnée. Son fonctionnement repose sur le même principe que des technologies telles que le Southern blot ou le Northern blot, qui sont couramment utilisées pour détecter et quantifier la présence d'une séquence nucléique spécifique au sein d'un échantillon biologique complexe, par hybridation à une sonde de séquence complémentaire portant un marquage radioactif. La confection des puces à ADN a permis d'étendre ce principe à la détection simultanée de milliers de séquences en parallèle. Une puce comporte quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers d'unités d'hybridation appelées « *spots* », chacune étant constituée d'un dépôt de fragments d'ADN ou d'oligonucléotides correspondant à des sondes de séquences données. L'hybridation de la puce avec un échantillon biologique, marqué par un radioélément ou par une molécule fluorescente, permet de détecter et de quantifier en une seule expérience, l'ensemble des cibles qu'il contient. D'abord conçues sur des membranes poreuses de nylon (appelées parfois « *macroarrays* » par opposition aux « *microarrays* »), les puces à ADN ont été progressivement mises au point sur lames de verre à la fin des années 90. La miniaturisation, rendue possible par l'utilisation d'un support solide, de marqueurs fluorescents et par les progrès de la robotique, permet aujourd'hui de fabriquer des puces comportant une très haute

densité de spots, susceptibles de recouvrir l'intégralité du génome d'un organisme sur une simple lame de microscope. On distingue plusieurs types de puces selon la densité des spots, le mode de fabrication, la nature des fragments fixés à la surface et les méthodes d'hybridation.

6.2.2. Les macroarrays

Les *macroarrays* sont des membranes de nylon sur lesquelles sont déposés des fragments d'ADN double brin. Avec la technologie actuelle, il est possible de fixer plus de 6000 éléments sur une membrane de 12 x 18 cm. Le principe de base de cette technique consiste en l'hybridation d'un échantillon inconnu d'ADNc avec des molécules disposées de façon régulière sur la membrane. Ceci va générer un profil particulier d'hybridation qui sera comparé à un profil produit par un échantillon différent, ou à un standard donné. Les sondes sont préparées par transcription reverse des ARNm en présence de ^{33}P -dATP. La membrane est ensuite sujette à un protocole d'hybridation standard. Après élimination par lavage des sondes non hybridées, la membrane est « lue » par un *imager*. L'identification et la quantification des signaux d'hybridation, ainsi que la soustraction du « bruit de fond » sont analysés par un programme de traitement d'images.

L'utilité des macroarrays à ADNc pour l'étude de l'expression des gènes chez les plantes supérieures a été démontrée par Desprez *et al.* (1998), qui ont utilisé une collection de 432 ADNc partiellement séquencés et fixés sur une membrane de nylon. Cette membrane a été utilisée pour une étude d'hybridation au cours de laquelle les sondes, préparées à partir d'ARNm de graines d'*Arabidopsis thaliana*, ont été marquées au ^{33}P . Le but de ce travail était de démontrer l'effet de la lumière sur l'expression des gènes dans les graines.

6.2.3. Les *microarrays* d'ADNc

Les éléments se trouvant sur les *microarrays* d'ADNc sont des séquences d'ADN simple brin. Ces puces sont produites par dépôt robotisé d'ADN cible dénaturé, provenant par exemple d'inserts amplifiés par PCR de clones d'ADNc ou d'EST, à des endroits déterminés sur une lame de microscope. Les techniques modernes permettent de construire des puces contenant près de 20.000 ADNc cibles (Schena *et al.*, 1995). Cette densité est beaucoup plus importante que dans le cas des filtres de nylon. Cette technique à haute densité permet donc de présenter la plupart (voire tous) des transcrits présents dans une cellule végétale sur une lame de microscope.

Les *microarrays* d'ADNc furent développées à la base pour *Arabidopsis thaliana* (Schena *et al.*, 1995). L'expression différentielle des gènes a été mesurée dans les racines et les tiges par utilisation d'une puce contenant 48 ADNc, testée avec un mélange de deux sondes marquées à la fluorescéine et à la lisamine. La comparaison des sorties obtenues avec les ARNm des racines et de la tige a pu mettre en évidence 26 gènes dont l'expression diffère plus de cinq fois entre ces deux organes.

6.2.4. Les *microarrays* d'oligonucléotides

L'utilisation de *microarrays* d'oligonucléotides fut proposée à la fin des années 1980, lorsque différents groupes de recherche développèrent indépendamment le concept de séquençage par hybridation. Cette technique permet de déterminer la séquence d'une molécule d'ADN par hybridation avec un ensemble complet d'oligonucléotides tel que tous les 65536 octamères possibles (Chetverin et Kramer, 1994). Lorsqu'il devint, petit à petit, apparent que ces *microarrays* pouvaient également être utilisées pour mesurer, à grande échelle, le niveau de transcription des gènes dans différents types cellulaires ou encore sous différentes conditions, l'intérêt pour cette technique bascula vers l'analyse transcriptionnelle.

Les *microarrays* d'oligonucléotides peuvent être produits de la même façon que les *microarrays* d'ADNc, c'est à dire par dépôt automatisé d'oligonucléotides présynthétisés. Cependant la densité des sondes peut atteindre ici les 30.000 éléments par cm^2 . Une manière différente de produire ces *microarrays* est la synthèse *in situ* d'oligonucléotides par photolithographie. Cette technique permet de produire des puces dont la densité peut atteindre 10^6 sondes par cm^2 .

Dans le domaine végétal, cette technique est très peu utilisée. Les raisons en sont exposées dans le paragraphe suivant.

6.2.5. Potentiel et limitations de ces puces

Les puces à ADNc. La technologie *macroarray* est relativement bon marché. En effet, vu que les filtres peuvent être réhybridés jusqu'à dix fois, un petit nombre de ces membranes est suffisant pour étudier l'expression de la plupart des gènes d'*Arabidopsis thaliana* dans deux conditions différentes. Par comparaison avec des clones disposés sur une *macroarray*, les *microarrays* sont 50 fois plus sensibles et permettent l'analyse simultanée de deux sondes différentes. Un gros désavantage de ces *arrays* est qu'elles ne sont utilisables qu'une seule fois et que le matériel requis est plus complexe. Un autre avantage est qu'aucune information sur la séquence n'est absolument requise, vu que les puces à ADNc peuvent être réalisées en utilisant des clones d'ADNc ou d'EST anonymes. Cependant, le nombre de clones requis pour que des ARNm peu abondants soient présents au moins une fois dans la banque d'ADNc utilisée pour construire la puce doit être important. De ce fait, l'utilisation des puces à ADNc pour détecter les transcrits peu abondants de gènes pas encore identifiés est limitée.

Les puces d'oligonucléotides. Un des avantages majeurs de ce genre de puce sur les puces à ADNc est que la préparation et le stockage des différentes espèces d'ADN peuvent être contournés par la synthèse *in situ* des oligonucléotides sur la puce. Afin d'assurer à chaque fragment de gènes, dérivé d'un génome inconnu, de former un hybride parfait avec au moins un élément de la puce, la *microarray* doit présenter toutes les séquences possibles d'oligonucléotides d'une longueur donnée. Cependant, une telle densité d'oligonucléotides ne peut être encore atteinte avec la technologie actuelle. De ce fait, l'étude de l'expression de la plupart des gènes d'un organisme donné via cette technique requiert la connaissance de la séquence du génome de cet organisme. Pour la majorité des espèces de plantes, cette information n'est pas encore disponible.

7. But de ce travail

Le but de ce travail sera, dans un premier temps, d'adapter au laboratoire une technique particulière d'étude différentielle de transcrits : l'AFLP-ADNc. Cette mise au point concernera toute les étapes que nécessite la technique (extraction d'ARN total, synthèse d'ADNc, restriction des ADNc et ligation d'adaptateurs, amplification présélective et sélective,...). Une sélection de type d'amorce à utiliser sera effectuée.

Une validation de la technique sera également réalisée afin de déterminer s'il est possible de cloner et de séquencer un fragment quelconque dont le pic correspondant à été identifié sur la sortie AFLP-ADNc.

Nous tenterons de mettre en évidence, l'induction ou la répression de gènes au sein de cellules en suspension d'*Arabidopsis thaliana* ayant subi un stress mimant une attaque pathogène.

Enfin, si des TDF différentiellement présents ont été identifiés, nous tenterons de cloner et de séquencer ces fragments afin de connaître les gènes dont sont issus ces TDF et d'en tirer des conclusions.

Matériel et méthodes

1. Culture d'*Arabidopsis thaliana* écotype Landsberg erecta (L-MM 1)

Lorsqu'un pathogène, quelle que soit sa nature, s'en prend à un végétal, chaque cellule réagit individuellement à cette agression. De ce fait, la présence de différents types cellulaires à différents stades de développement et de différenciation complique considérablement l'étude des interactions « plantes-pathogènes ». Sur le plan expérimental, il est donc beaucoup plus intéressant de disposer d'une population cellulaire homogène. L'utilisation de cellules cultivées en suspension permet de résoudre ce problème d'uniformité cellulaire et d'obtenir en plus, une grande quantité de matériel végétal synchronisé.

Au cours de ce mémoire, nous avons choisi de travailler sur la culture en suspension de cellules d'*Arabidopsis thaliana* écotype Landsberg erecta (L-MM 1), un matériel de référence pour de nombreuses études (Menges and Murray, 2002).

1.1. Composition du milieu de culture

1.1.1 Milieu MSMO

Ce milieu de culture est utilisé au laboratoire pour maintenir, de semaine en semaine, des cultures en suspension de cellules d'*Arabidopsis thaliana*. Il fournit l'ensemble des éléments requis à la bonne croissance de ces cellules.

Matériel

- MSMO (Murashige and Skoog Basal salt with minimal organic, Sigma #M6899)
- Sucrose
- Eau désionisée
- Kinetine (stock 1mg/ml)
- NAA (stock 1mg/ml)

Protocole

- Dissoudre 4.43 g de MSMO et 30 g de sucrose dans 900 ml d'eau désionisée
- Ajuster le pH à 5.7 par ajout de KOH 1M et mettre à volume (1000 ml)
- Ajouter 500µl de NAA et 50 µl de kinetine (stérilement)
- Autoclaver le milieu

1.1.2. Milieu d'élicitation

Ce milieu particulier va permettre de fournir les conditions ioniques optimales requises à la formation d'une conformation en « boîte à œufs » des fragments pectiques lors de l'élicitation (notamment au niveau du rapport $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$). Ce milieu a été mis au point au laboratoire, sa composition est la suivante :

- | | |
|-----------------------------------|-----------|
| • Sucrose | 30 g/l |
| • Microéléments 10X (Sigma M0529) | 100 ml/l |
| • Vitamines 1000X (Sigma M3900) | 1 ml/l |
| • Macroéléments : | |
| CaCl ₂ | 55,3 mg/l |
| KH ₂ PO ₄ | 170 mg/l |
| KNO ₃ | 1,9 g/l |
| MgSO ₄ | 180 mg/l |

- | | |
|--------------------------|----------|
| NH_4NO_3 | 1,65 g/l |
| • NaCl 1M | 30 ml/l |

Tout ces éléments sont dissous dans 900 ml d'eau désionisée, la suite du protocole est en tout point identique à celle de la préparation du milieu MSMO.

1.2. Conditions de culture

Le cellules sont cultivées dans 50 ml de milieu de culture MSMO dans des erlenmeyers de 250 ml maintenus à 25°C sous agitation constante (110 rpm) dans une chambre de culture dont la photopériode est de 16 heures de lumière pour 8 heures d'obscurité. Après sept jours de culture, les cellules sont repiquées stérilement comme suit : 5 ml de suspension pour 45 ml de milieu frais MSMO. Les cellules sont ainsi maintenues de semaines en semaine.

2. Préparation de l'éliciteur

2.1. Production des oligogalacturonides

Les oligogalacturonides de degrés de polymérisation supérieurs ou égaux à 9 ($DP \geq 9$) sont produits par hydrolyse acide de pectate de sodium et précipitation au chlorure de baryum ($BaCl_2$). Les $DP \geq 9$ sont capables de former des complexes intermoléculaires en présence de calcium et constituer ainsi une conformation dite en « egg - box ». La formation de ces complexes avec le baryum rapproche fortement les deux chaînes d'oligogalacturonides et induit leur précipitation.

2.2. Analyse des oligogalacturonides par HPLC

Les oligogalacturonides, possédant une fonction carboxylique chargée négativement à pH neutre, peuvent de ce fait être séparés au moyen d'une résine échangeuse d'anions. Plus le degré de polymérisation est élevé, plus ceux-ci possèdent des charges négatives et plus ils seront retenus par une telle résine.

La colonne HPLC utilisée (Carbo Pac PA-100) contient une résine (polystyrène-divinylbenzène) comportant des groupements sulfites (SO_3^-) sur lesquels sont greffés des groupements amines (NR_3^+).

L'élution des oligogalacturonides fixés sur la colonne est obtenue au moyen d'un gradient d'acétate de sodium ($NaOAc$). Les groupements hydroxyles des sucres sont ionisés par du $NaOH$ 0,5 M en sortie de la colonne et détectés par ampérométrie pulsée.

Cette détection est réalisée via une séquence de trois potentiels (E_1, E_2 et E_3) appliqués pendant une durée spécifique (respectivement t_1, t_2 et t_3) au niveau d'une électrode en or placée à la sortie de la colonne HPLC. E_1 est le potentiel auquel est mesuré le courant qui résulte de l'oxydation des oligopectates. E_2 est un potentiel positif permettant de nettoyer la surface de l'électrode. Enfin, E_3 , est un potentiel qui permet de réduire l'oxyde d'or en or métallique.

3 Elicitation des cellules d'*Arabidopsis thaliana*

Trois jours avant l'élicitation, 15 ml de cellules en suspension d'*Arabidopsis thaliana* de sept jours (mimieu MSMO) sont prélevés et placés dans 135 ml de milieu d'élicitation. Ces 150 ml de suspension cellulaire sont maintenus à 25°C sous agitation constante (110 rpm) dans une chambre de culture dont la photopériode est de 16 heures de lumière pour 8 heures d'obscurité. Le troisième jour, sous hotte, les cellules en suspension sont réparties dans des erlenmeyers de 100 ml à raison de 20 ml par flacon.

Une solution de 20 mg/ml d'oligopectate de $DP \geq 9$ est préparée dans de l'eau stérile. Cette solution est ensuite filtrée à l'aide d'un filtre Millex®GP (0,22 µm).

200 µl de cette solution sont ensuite prélevés et transférés dans les erlenmeyers contenant les cellules destinées à être élicitées. La concentration finale en oligopectates dans le milieu de culture est donc de 200 µg/ml (Messiaen and Van Cutsem, 1994).

Les cellules élicitées et non-élicitées (contrôles) sont replacées sur agitateur orbital (110 rpm) à 25°C et seront prélevées à des temps déterminés par l'expérimentateur pour analyse.

4. Clonage des fragments dérivés de transcrits

4.1 Dosage des acides nucléiques

Les acides nucléiques absorbent la lumière ultra violette (U.V.) à une longueur d'onde de 260 nm. Une unité de densité optique (DO) correspond à une concentration connue en ADN ou en ARN (50 µg/µl pour de l'ADN double brin, 40 µg/µl pour de l'ARN et 33 µg/µl pour de l'ADN simple brin).

4.1.1. Dosage

- Placer 1 ml d'eau DEPC dans une cuvette du spectrophotomètre et effectuer la mise à zéro
- Ajouter 1 µl de la solution d'acide nucléique dans la cuvette
- Pipeter afin de mélanger le tout
- Mesurer la densité optique à 260 nm
- Adapter la dilution afin que cette DO soit comprise entre 0.1 et 1
- Multiplier cette valeur par celle la concentration donnée par une DO de l'acide nucléique en question et par sa dilution

4.1.2. Pureté de l'ARN

La pureté de l'ARN peut être estimée en calculant le rapport de l'absorbance à 260 nm et de l'absorbance à 280 nm. Théoriquement, de l'ARN pur a un rapport de 2.

4.2. Electrophorèse horizontale sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer des fragments d'acide nucléique en fonction de leur taille. La vitesse de migration de ces fragments dans le gel d'agarose est inversement proportionnelle à leur taille. Les acides nucléiques sont détectés dans le gel en présence de bromure d'éthidium (BET). Ce dernier s'intercale entre les deux brins des molécules bicaténares et peut être visualisé par passage du gel sur un transilluminateur U.V. La taille des fragments d'ADN est estimée en faisant co-migrer un étalon de fragments d'ADN de taille connue. Les étalons utilisés au cours de ce mémoire sont le Smart-Ladder (EUROGENTEC) et le Smart-Ladder SF (EUROGENTEC). Ce dernier, permet d'estimer la taille de fragments inférieures à 1000 paires de bases.

Matériel

- Tampon TAE 1X (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0)
- Agarose x % (le pourcentage est à adapter selon la taille des fragments à séparer)
- Bromure d'éthidium (solution stock à 10 mg/ml)
- Bleu de bromophénol 2x (glucose 40 %, bleu de bromophénol 0,025%)
- Smart-Ladder ou Smart-Ladder SF (EUROGENTEC)
-

Protocole

- Préparer un gel d'agarose 2% dans le tampon TAE 1x
- Ajouter 3µl de BET par 50 ml de gel
- Couler le gel dans un support adéquat doté de peignes et laisser refroidir le gel
- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse (Pharmacia)
- Ajouter 1 volume de bleu de bromophénol à 1 volume d'échantillon à analyser

- Déposer le mélange dans chacun des puits
- Faire migrer l'échantillon pendant 45 minutes à 90 mA dans le tampon d'électrophorèse TAE 1x
- Visualiser les bandes au transilluminateur réglé à 302 nm

4.3. Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADNc

4.3.1. Extraction des ARN totaux au TriPure™

Le TriPure™ (Roche) est une solution monophasique de phénol et d'isothiocyanate. Ce réactif maintient l'intégrité de l'ARN lors de la destruction et de la dissolution des composants cellulaires. L'addition de chloroforme, suivie d'une centrifugation, sépare la solution en une phase aqueuse et une phase organique contenant l'ARN. Après élimination de la phase aqueuse, l'ARN est récupéré par précipitation avec de l'alcool isopropylique.

Matériel

- Mortiers, pillons et filtres d'une porosité de 0,45 µm (Witeg) traités avec une solution de lavage (NaOH 1M, SDS 1%), rincés à l'eau DEPC, et incubés au four pasteur (une nuit à 180°C)
- Embouts et tubes Eppendorfs autoclavés
- Eau DEPC (0.1% DEPC, incubé une nuit à 37°C et ensuite autoclaver)

Protocole

- Filtrer le milieu de culture sur Buchner relié au vide
- Plonger immédiatement le filtrat (les cellules) dans l'azote liquide
- Broyer ces cellules sous azote à l'aide d'un pilon
- Transférer le broyat dans un tube Falcon de 50 ml taré
- Peser le matériel ainsi obtenu
- Ajouter 1 ml de TriPure par 100 mg de matériel congelé
- Agiter le tube à la main pour aider à la décongélation et à l'homogénéisation
- Aliquoter l'homogénat dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml
- Centrifuger à 5000 rpm pendant 20 min à 4°C afin de culotter les résidus insolubles
- Reprendre le surnageant dans un autre tube et ajouter 0,2 ml de chloroforme par ml de TriPure
- Mélanger par inversion pendant 15 sec et laisser reposer pendant 5 minutes à température ambiante. Répéter cette opération une seconde fois
- Centrifuger à 12000 rpm pendant 15 min à 4°C
- Prélever la phase supérieure (phase aqueuse) en veillant à ne pas toucher l'interface protéique.
- Précipiter l'ARN par ajout de 0,5 ml d'alcool isopropylique par ml de TriPure
- Mélanger doucement par inversion pendant 15 sec et laisser 10 min à température ambiante.
- Centrifuger à 12000 rpm pendant 15 min 4°C
- Éliminer le surnageant
- Laver le culot avec 1 ml d'éthanol 75% (dilué dans de l'eau DEPC) et mélanger l'échantillon de manière à décoller le culot
- Centrifuger à 7500 rpm pendant 5 min à 4°C
- Enlever délicatement le surnageant et sécher le culot à l'air libre
- Resuspendre le culot dans de l'eau DEPC (20µl/100mg de cellules de départ)
- Incuber les ARN à 55°C pendant 10 min afin d'aider à la dissolution
- Vérifier la pureté et l'intégrité des ARN totaux
- Conserver les ARN à -80°C

4.3.2. Synthèse d'ADNc

Au cours de ce travail, le kit cDNA Synthesis System (Roche® réf. 1 117 831) a été utilisé. C'est une méthode de synthèse d'ADNc à partir d'ARNm ou ARN totaux qui se déroule en quatre étapes : la synthèse du premier brin d'ADNc via une AMV reverse transcriptase, la synthèse du deuxième brin d'ADNc via une T4 DNA polymérase, la digestion de l'ARN et enfin le lavage de l'ADNds.

Le protocole fourni avec ce kit a été suivi scrupuleusement. Lors de la première étape, l'amorce utilisée est l'oligo dT₁₅ primer. Le culot d'ADNc double brin a été resuspendu, après lavage, dans 10 µl d'eau désionisée.

Une vérification de la présence de cet ADNc a été réalisée par amplification PCR de ce matériel néosynthétisé avec des amorces amplifiant le gène de la tubuline. Le mélange PCR et le programme utilisé pour l'amplification sont les suivants :

Protocole

- Préparer le mélange PCR suivant

ADNc	1	µl
dNTP (10 mM)	1	µl
Amorce 5'	0,5	µl
Amorce 3'	0,5	µl
Taq (Roche)	0.25	µl
Tampon PCR concentré 10X	2,5	µl
Eau désionisée	19,25	µl

- Placer les échantillons dans l'appareil PCR (i-cycler de BIORAD) et lancer le programme suivant :

Étape	Température (°C)	Durée (minutes)	Répétition
Dénaturation	95	05 :00	1X
Cycle	95	00 :30	30 X
	60	01 :00	
	75	03 :00	
Elongation	75	10 :00	1 X
Conservation	10	infini	1 X

Séquences des amorces utilisées :

Amorce gauche : 5'-AGGTACACCGGAGACTCAGAT-3'

Amorce droite : 5'-GTGAGGGAACGGTACTGCTG-3'

4.4. AFLP sur ADNc

Comme vu précédemment, l'AFLP sur ADNc est une technique relativement récente (1996) reposant sur quatre grandes étapes (Bachem *et al.*, 1996) : (1) restriction de l'ADNc et ligation d'adaptateurs oligonucléotidiques ; (2) amplification présélective des produits de ligation avec des amorces s'hybridant aux adaptateurs ; (3) amplification sélective des produits de préamplification via des amorces PCR portant des nucléotides sélectifs à leur extrémité 3' et (4) analyse des fragments ainsi obtenus par électrophorèse avec détection de la sonde fluorescente fixée aux différents fragments.

Lors de ce mémoire, les enzymes de restriction EcoRI et MseI seront utilisées ainsi que les adaptateurs correspondants.

4.4.1. Restriction de l'ADNc et ligation d'adaptateurs

Protocole

- Préparer le mélange réactionnel suivant :

Réactifs	Volume/échantillon (µl)
T4 DNA Ligase Buffer with ATP (New England Biolabs)	0,55
NaCl 0,5 M	0,55
BSA 1 mg/µl (Sigma)	0,275
Mse I 5U/µl (Invitrogen)	0,1
EcoR I 10U/µl (Invitrogen)	0,25
Mse I Adaptateur (5µM)	0,5
EcoR I Adaptateur (50 µM)	0,5
Ligase T4 DNA (20 U) (New England Bio labs)	0,05

- Ajouter 2.75 µl d'ADNc par échantillon
- Placer les échantillons dans l'appareil PCR (BIORAD) et lancer le programme suivant :

Réaction de Restriction-Ligation		
Étapes	Température (°C)	Durée
Restriction	37	2 heures 30 minutes
Ligation	20	3 heures
Ligation	16	Infini

- Stocker le produit de « restriction-ligation » à 4°C jusqu'à utilisation

Remarque : Les adaptateurs EcoR I et Mse I ont été obtenus par hybridation de deux oligonucléotides dans un bain porté à 95°C pendant 10 minutes, puis laissé refroidir jusqu'à température ambiante. Stocker à -20°C

EcoR I : oligo 1 – 5' - CTCGTAGACTGCGTAC-3'
 oligo 2 – 5' - CTGACGCATGGTTAA-3'

Mse I : oligo 1 – 5' - GACGATGAGTCCTGAG-3'
 oligo 2 – 5' - TACTCAGGACTCAT-3'

4.4.2. Amplification présélective

Protocole

- Diluer 10X le produit de la restriction-ligation en ajoutant 49,5 µl de Tris 10 mM pH 8,0
- Préparer ensuite le mélange réactionnel suivant :

1 base spécifique

01	A
02	C
03	G
04	T

2 bases spécifiques

11	A	A
12	A	C
13	A	G
14	A	T
15	C	A
16	C	C
17	C	G
18	C	T
19	G	A
20	G	C
21	G	G
22	G	T
23	T	A
24	T	C
25	T	G
26	T	T

3 bases spécifiques

31	A	A	A
32	A	A	C
33	A	A	G
34	A	A	T
35	A	C	A
36	A	C	C
37	A	C	G
38	A	C	T
39	A	G	A
40	A	G	C
41	A	G	G
42	A	G	T
43	A	T	A
44	A	T	C
45	A	T	G
46	A	T	T
47	C	A	A
48	C	A	C
49	C	A	G
50	C	A	T
51	C	C	A
52	C	C	C
53	C	C	G
54	C	C	T
55	C	G	A
56	C	G	C
57	C	G	G
58	C	G	T
59	C	T	A
60	C	T	C
61	C	T	G
62	C	T	T

63	G	A	A
64	G	A	C
65	G	A	G
66	G	A	T
67	G	C	A
68	G	C	C
69	G	C	G
70	G	C	T
71	G	G	A
72	G	G	C
73	G	G	G
74	G	G	T
75	G	T	A
76	G	T	C
77	G	T	G
78	G	T	T
79	T	A	A
80	T	A	C
81	T	A	G
82	T	A	T
83	T	C	A
84	T	C	C
85	T	C	G
86	T	C	T
87	T	G	A
88	T	G	C
89	T	G	G
90	T	G	T
91	T	T	A
92	T	T	C
93	T	T	G
94	T	T	T

Figure 1. Représentation du code des amorces utilisées en AFLP-cDNA et en AFLP.

Réactifs	Volume / échantillon (µl)
Amorce E00 (Eurogentec)	0,5
Amorce M00 (Eurogentec)	0,5
AFLP Amplification Core Mix (AFLP Ligation and Preselective Amplification Module ABI)	7,5
Produit de restriction-ligation dilué 10 X	4

- Placer les échantillons dans l'appareil PCR (BIORAD) et lancer le programme suivant :

Réaction de pré-amplification			
Etape	Température (°C)	Durée (minutes)	Répétition
Dénaturation longue	94	02 :00	1X
Cycle	94	00 :20	20 X
	56	00 :30	
	76	02 :00	
Elongation longue	60	30 :00	1 X
Conservation	4	infini	1 X

Séquences des amorces utilisées :

E00 : 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'
M00 : 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'

4.4.3. Amplification sélective

L'amplification sélective consiste en une seconde amplification à l'aide d'amorces possédant chacune un certain nombre de bases aléatoires supplémentaires (Figure 1). Au cours de ce travail, nous utiliserons à chaque fois une seule base supplémentaire aléatoire. L'amorce EcoRI sélective est marquée à l'aide d'un fluorochrome. Dans notre cas, il s'agit de D4-PA de Dye WellRed développé par la firme Beckman (<http://www.beckmancoulter.com>) et commercialisé sous licence par Proligo (www.proligo.com). Les propriétés spectrales de cette sonde fluorescente sont les suivantes :

Excitation maximale 650 nm
Emission maximale 670 nm
Coefficient d'extinction molaire 203,000

Protocole

- Diluer 10 X le produit de pré-amplification en ajoutant 112,5 µl de Tris 10 mM pH 8,0.
- Faire le mélange réactionnel suivant :

Réactifs	Volume/échantillon (µl)
Primer MseI-CNN (5 µM) (Eurogentec)	0,5
Primer D4-EcoRI-ANN (1 µM) (Proligo)	0,5
AFLP Amplification Core Mix (AFLP Ligation and Preselective Amplification Module ABI)	7.5
Produit d'amplification présélective dilué 10 X	1.5

- Placer les échantillons dans l'appareil PCR (BIORAD) et lancer le programme suivant :

Cycle	Répétition	Etape	Température (°C)	Durée (minutes)
Cycle 1	1X	Dénaturation longue	94	02 :00
Cycle 2	10X	Dénaturation	94	00 :20
		Hybridation	66	00 :30
		<i>Diminution de la T° après le cycle 1 d'1°C par cycle</i>		
		Elongation	72	02 :00
Cycle 3	20X	Dénaturation	94	00 :20
		Hybridation	56	00 :30
		Elongation	72	02 :00
Cycle 4	1X	Elongation longue	60	30 :00
Cycle 5	1X	Conservation	4	infini

4.4.4. Séparation des TDF marqués par électrophorèse capillaire

- Dans un Eppendorf contenant 360 µl de Sample loading solution (SLS) (Beckman) ou de formamide désionisée, ajouter 4,5 µl de standard de taille 600
- Vortexer le mélange
- Dans chacun des huit puits d'une rangée de la plaque multipuits, déposer 38 µl de ce mélange
- Ajouter ensuite 2 µl du produit d'amplification sélective et couvrir le tout avec une goutte d'huile minérale
- Dans une autre plaque, ajouter dans chaque puit 8 à 9 gouttes de CEQ sequencing separation buffer
- Placer ces deux plaques à l'endroit prévu dans l'analyseur de fragments
- Lancer la méthode de séparation frag-4 (CEQ 8000 Genetic analysis system) dont les paramètres sont les suivants :
 - Température des capillaires lors de la migration : 50°C
 - Température de dénaturation : 90°C, durée : 120 secondes
 - Injection : voltage : 2 kV, durée : 30 secondes
 - Séparation : voltage 4,8 kV, durée : 60 minutes
- Analyser les séquences avec les paramètres d'analyse par défaut

4.5. Purification des produits d'amplification AFLP

Le produit d'amplification va être purifié à l'aide du kit Microcon Centrifugal Devices (millipore) afin d'éliminer tout résidu pouvant nuire au clonage dans pCR II (dNTPs, amorces, etc,...).

Protocole

- Diluer 80 µl du produit d'amplification dans 420 µl d'eau stérile
- Placer une colonne Microcon sur un tube Eppendorf de 1,5 ml
- Ajouter les 500 µl du produit d'amplification dilués sur la colonne et centrifuger à 7000 rpm pendant 12 min
- Reprendre la colonne Microcon, la retourner dans un nouveau tube, Ajouter 20 µl d'eau stérile, attendre 5 min et centrifuger pendant 10 min à 4000 rpm
- Ajouter 20 µl d'eau stérile et conserver à -20°C

4.6. Culture d'*Escherichia coli*.

4.6.1. Milieu LB

Le milieu LB est un milieu riche non sélectif convenant à de nombreuses espèces bactériennes.

- Peser ces trois composants suivant le volume de milieu à préparer.

Bactotryptone	10 g/l
Extrait de levure	5,0 g/l
NaCl	10 g/l

- Pour du milieu solide, ajouter 15 g/l de Plant Agar (Duchefa Biochemie #1001.1000).
- Mettre à volume avec de l'eau désionisée
- Ajuster le pH à 7
- Autoclaver aussitôt

La sélection des bactéries recombinantes est réalisée sur milieu LB contenant de l'ampiciline ou de la kanamycine. L'ampiciline est ajoutée, à partir d'une solution stock à 10 mg/ml, sur la boîte de Pétri à une concentration finale de 60 µg/ml et la kanamycine est ajoutée, à partir d'une solution stock à 5mg/ml à une concentration finale de 100 µg/ml.

4.6.2. Milieu SOC

Ce milieu est fourni dans le kit ONE Shot® et intervient dans le processus de transformation des bactéries compétentes TOP 10 F'. Pour information, en voici sa composition :

Bactotryptone	2%
Extrait de levure	0,5%
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
Glucose	20 mM
MgSO ₄	10 mM

4.7. Clonage dans le plasmide pCR II

Le plasmide pCR II est un vecteur linéarisé possédant une extrémité 3' protubérante flanquée d'une déoxythymidine. Ce vecteur permet donc le clonage de fragments PCR ayant été amplifié par la Taq polymérase. En effet, cette enzyme possède la caractéristique d'ajouter une déoxyadénosine supplémentaire à l'extrémité 3' des produits PCR.

Au cours de ce mémoire, le kit TA Cloning kit dual promoter® (Invitrogen®) a été utilisé.

4.7.1. Ligation des produits d'amplification

Les produits d'amplifications purifiés (voir point 4.5.) vont être ligués dans le vecteur pCR II sous l'action de la T4 DNA ligase. La réaction est effectuée dans un volume final de 10 µl.

- Ajouter :
 - x µl du produit d'amplification purifié
 - 2 µl de vecteur linéarisé (25 ng/µl)
 - 1 µl de 10x ligation buffer
 - 1 µl de T4 DNA ligase (4U/µl)
- Incuber une nuit à 15°C

4.7.2. Transformation des bactéries

Les bactéries utilisées pour ce clonage sont des bactéries compétentes (souche TOP 10 F') (Invitrogen). Ces bactéries seront transformées par choc thermique.

Protocole

- Décongeler les cellules compétentes (50µl) dans la glace
- Sous hotte, ajouter 2 µl du produit de ligation et mélanger doucement à l'aide de l'extrémité de l'embout stérile
- Incuber les cellules 30 min sur glace

- Effectuer le choc thermique pendant 30 secondes dans un bain thermostatisé à 42°C
- Retirer les cellules du bain et les placer immédiatement sur glace
- Incuber les sur glace pendant 2 min
- Ajouter 250 µl de milieu SOC (maintenu à température ambiante) et incuber sous agitation horizontale (225 rpm) à 37°C pendant 1 heure
- Étaler deux volumes de cellules sur milieu sélectif et incuber à 37°C pendant 1 nuit

4.7.3. Criblage « blanc-bleu » des plasmides recombinants

Le test « blanc-bleu » est une méthode de sélection de bactéries transformées basée sur la propriété de complémentation intragénique que possèdent les recombinants issus de la transformation.

La β -galactosidase est une enzyme responsable de la dégradation du galactose en lactose et en fructose. La souche bactérienne TOP 10 F', déficiente en β -galactosidase, possède cependant un épisome F' dont une partie code pour la région C-terminale inactive α' de cette enzyme. La partie N-terminale inactive α est quant à elle codée par une portion du gène se trouvant dans le vecteur de transformation (pCRII). Dans les bactéries transformées, il y aura donc complémentation intragénique lors de l'assemblage des peptides α et α' inactifs. Ce processus conduira à la formation d'une β -galactosidase active. L'activité de la β -galactosidase peut être facilement visualisée *in vivo* grâce à un test dit « blanc-bleu ». Pour cela, le substrat naturel de l'enzyme (le galactose) est remplacé par du X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside). Incolore, le X-Gal donne un produit bleu lorsqu'il est clivé par l'enzyme. Il suffit donc d'ajouter du X-Gal et de l'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside), un activateur de la transcription de la β -galactosidase, afin de visualiser la présence d'une enzyme active. Ce processus est appelé l' α -complémentation.

Cette propriété est utilisée dans de nombreux vecteurs de clonage afin de distinguer les bactéries véhiculant un vecteur recombinant de celles qui véhiculent un vecteur non recombinant. Pour cela, le segment du gène lac Z codant pour le peptide α est placé à cheval sur le site multiple de clonage. Lorsque de l'ADN est inséré à ce niveau, il interrompt le peptide α et les colonies bactériennes apparaissent blanches sur les boîtes de Pétri. Par contre, si aucun ADN n'est inséré, l' α -complémentation peut avoir lieu et les bactéries apparaissent bleues.

Protocole

- Sous hotte, étaler les bactéries transformées sur le milieu LB solide contenant l'antibiotique (ampicilline ou kanamycine) ainsi que 28 µg/ml d'IPTG et 28 µg/ml de X-Gal
- Incuber les cellules à 37°C pendant une nuit
- Repiquer les colonies blanches sur un nouveau milieu LB contenant l'antibiotique
- Incuber ces cellules à 37°C pendant une nuit
- Stocker les boîtes de Pétri à 4°C afin de stopper la croissance des bactéries

5. Analyse des colonies

5.1. Réaction PCR de sélection sur colonies

Les vecteurs pCRII des différentes colonies potentiellement intéressantes, vont être analysés afin de déterminer la taille des différents inserts. Pour cela, une PCR va être réalisée directement sur les colonies et ce, à l'aide des amorces universelles de pCRII, externes à l'insert.

Protocole

- Préparer le mélange PCR suivant :

dNTP (10 mM)	1 µl
Amorce FORWARD	1 µl
Amorce REVERSE	1 µl
Taq (Boehringer Mannheim)	0.4 µl
Tampon PCR concentré 10X	5 µl
Eau désionisée	41,6 µl

Ce mélange est prévu pour 5 tubes contenant 10 µl de mélange PCR.

- Sous hotte, Piquer à l'aide de la pointe d'un embout stérile une colonie intéressante
- Pipeter ensuite dans le mélange PCR afin d'y incorporer les bactérie se trouvant à l'extrémité de l'embout
- Placer les échantillons dans l'appareil PCR (BIORAD) et lancer le programme suivant :

Etape	Température (°C)	Durée (minutes)	Répétition
Dénaturation	95	03 :00	1X
Cycle	95	01 :00	30 X
	60	01 :00	
	75	03 :00	
Elongation	75	05 :00	1 X
Conservation	4	infini	1 X

Séquences des amorces utilisées :

FORWARD : 5'-CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC-3'
 REVERSE : 5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGAA-3'

5.2. Détermination précise de la taille des inserts

Afin de déterminer précisément la taille des inserts des vecteurs présents dans les bactéries sélectionnées précédemment, une amplification PCR sur colonies est réalisée à l'aide des mêmes amorces utilisées pour l'amplification sélective des TDF au cours de la dernière étape de l'AFLP. Le protocole suivi est donc identique à celui exposé au point 4.4.3. hormis le fait que l'amplification se fait directement sur colonies.

Le produit PCR est ensuite analysé par électrophorèse capillaire et le fragment marqué et amplifié est détecté en sortie du capillaire par un laser. Ce processus permet ainsi de déterminer très précisément la taille de l'insert.

5.3. Séquençage des inserts d'intérêt

La caractérisation fine d'un gène ou de tout autre fragment d'ADN passe par son séquençage, c'est-à-dire par la connaissance du nombre, de la nature et de l'ordre des nucléotides qui le composent. La technique de séquençage utilisée au cours de ce mémoire est celle du séquençage enzymatique par incorporation de didéoxynucléotides. Les didéoxynucléotides (ddNTP) sont des désoxynucléotides modifiés, capables de s'intégrer dans une chaîne d'ADN en élongation, mais empêchant l'incorporation du nucléotide suivant.

La méthode utilisée ici est celle du « dye terminator ». Cette méthode met en œuvre des ddNTP marqués chacun avec un fluorochrome spécifique. Chaque fois qu'un ddNTP est incorporé à une position lors de l'élongation, cette dernière est stoppée, ce qui génère un ensemble de molécules de tailles différentes, mais se terminant toutes par un ddNTP marqué avec un des quatre fluorochromes différents. Les différents fragments marqués néosynthétisés sont ensuite séparés suivant leur taille par électrophorèse capillaire et ce, au nucléotide près. Les fragments d'ADN sont analysés automatiquement en sortie du gel par un système de laser permettant d'identifier le fluorophore. Les résultats sont transférés sur ordinateur et un programme informatique permet d'avoir accès au chromatogramme correspondant à la séquence.

Matériel

- CEQ DTCS quick start kit (Beckman #608120).
- CEQ Sequencing reaction buffer kit (Beckman #608074)
- Stop solution : 1 µl de glycogène (Roche #901303), 2 µl d'acétate de sodium 3 M (sigma #S-7899), 1,6 µl d'eau désionisée, 0,4 µl d'EDTA 0,5 M (sigma #E-7889)
- CEQ Sample loading solution (SLS) (Beckman #608082)
- CEQ sequencing separation buffer (Beckman #608012)
- Séquenceur Beckman CEQ 8000

Protocole

- Préparer un mélange contenant 1 µl d'amorce FORWARD ou REVERSE (10 pmoles/µl), X µl d'ADN (à déterminer suivant la quantité d'ADN). Ajuster le volume à 10 µl avec de l'eau stérile
- Dénaturer le mélange à 95°C pendant 15 min et placer immédiatement sur glace pendant 3 minutes
- Ajouter 4 µl de CEQ DTCS quick start kit, 1 µl de CEQ Sequencing reaction buffer kit et 5 µl d'eau milliQ
- Lancer une réaction de séquençage avec le programme suivant : 92°C pendant 1'30'' ; 40 cycles définis comme suit : 20'' à 96°C, 20'' à 50°C et 4' à 60°C et enfin 4°C à l'infini
- Purifier le produit par ajout de 20 µl de solution de séquençage (5 µl de Stop solution et 60 µl d'éthanol 96% froid)
- Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm et éliminer le surnageant.
- Laver avec 200 µl d'éthanol 76%, centrifuger 15 minutes à 13000 rpm, éliminer le surnageant et refaire cette étape une seconde fois
- Sécher le culot au speedvac pendant 25 minutes
- Ressuspendre dans 40 µl de SLS, placer l'échantillon dans un puit d'une plaque de séquençage et couvrir le tout par une goutte d'huile minérale
- Dans une autre plaque, ajouter dans chaque puit 8 gouttes de CEQ sequencing separation buffer
- Placer ces deux plaques à l'endroit prévu dans l'appareil de séquençage
- Lancer la méthode de séparation LFR-a (CEQ 8000 Genetic analysis system) dont les paramètres sont les suivants :
 - Température des capillaires lors de la migration : 50°C
 - Température de dénaturation : 90°C, durée : 120 secondes
 - Injection : voltage : 2 kV, durée : 15 secondes
 - Séparation : voltage 4 kV, durée : 110 minutes
- Analyser les séquences avec les paramètres d'analyse par défaut

Résultats et discussion

1. Introduction

Pour rappel, l'objectif de ce mémoire est de mettre en évidence, par la technique de l'AFLP-ADNc, l'expression ou la répression de gène chez des cellules en suspension d'*Arabidopsis thaliana*, suite à un traitement aux oligopectates de $DP \geq 9$. En d'autres termes, nous allons tenter de montrer que cette technique combinée aux techniques de clonage et de séquençage, est apte à identifier la nature d'un gène différentiellement exprimé comparativement à une situation contrôle où les cellules n'ont pas été traitées.

2. Stimulation des cellules en suspension d'*Arabidopsis thaliana* écotype Landsberg erecta (L-MM 1) par les oligogalacturonides

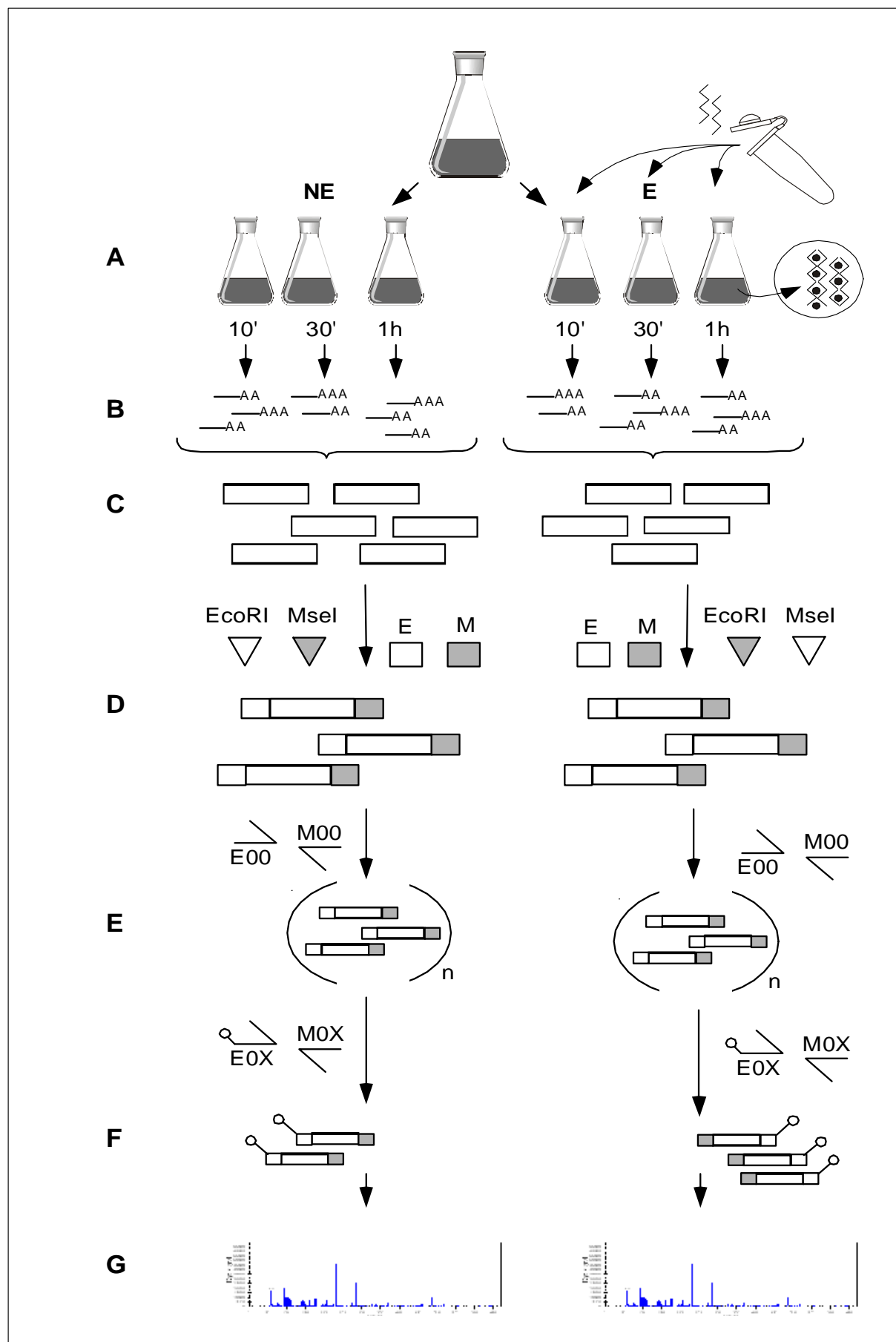
Des cultures en suspension de cellules d'*Arabidopsis thaliana* ayant passé trois jours dans un milieu de culture particulier (milieu d'élicitation) ont été stimulées par des oligogalacturonides de $DP \geq 9$ (Figure 1A). Ce milieu d'élicitation possède une composition ionique particulière permettant l'adoption par les fragments pectiques en question, d'une conformation en « egg - box », conformation induisant les réponses de défenses chez le végétal. Trois temps sont considérés pour l'analyse des réponses transcriptionnelles : 10 minutes, 30 minutes et enfin 1 heure. Très peu d'articles scientifiques traitent des réponses de défenses chez des cellules en suspension d'*Arabidopsis* suite à une telle élicitation. Messiaen et Van Cutsem (1994) ont montré que, dans des cellules de carotte traitées avec des oligogalacturonides de DP 9 à 16, la plupart des gènes analysés (PR-1, PR-2, CHS, PAL,...) est activée après seulement 30 min, mais que les ARN messagers continuent à s'accumuler pour atteindre un maximum après 3 heures voire même 6 heures. Un modèle cellulaire n'en étant pas un autre, nous avons considéré ces trois temps (10 min, 30 min et 1 heure) afin de déterminer de potentielles réponses de défense précoces dans le système *Arabidopsis*.

3. Détermination de gènes différentiellement exprimés

3.1. Introduction

La démarche adoptée afin d'identifier des gènes différentiellement exprimés se déroule en six grandes étapes (Figure 1).

Figure 1: (voir page suivante). Démarche mise en œuvre afin d'identifier des gènes différentiellement exprimés par la technique d'AFLP-ADNc. **A**, stimulation de cellules avec des oligogalacturonides de $DP \geq 9$. **B**, extraction des ARN totaux aux différents temps (10', 30' et 1h). **C**, regroupement des ARN totaux et synthèse d'ADNc. **D**, restriction des ADNc et ligation de deux adaptateurs spécifiques (E et M) aux extrémités des ADNc restreints. **E**, amplification préselective des produits de restriction-ligation via le couple d'amorce E00-M00. **F**, amplification sélective réalisée à l'aide des couples d'amorces E0x-M0x (x=1 à 4) dont les amorces E0x sont porteuses d'un fluorochrome. **G**, Analyse comparée des deux sorties obtenues (« élicitée » et « non élicitée ») et identification de pics différentiellement présent. **E**, élicité ; **NE**, non élicité ; **DP**, degré de polymérisation.



La première étape consiste à isoler les ARN totaux des cellules traitées et non traitées (Figure 1B). Afin d'extraire les ARN des cellules, ces dernières sont filtrées et immédiatement plongées dans l'azote liquide pour broyage ultérieure en vue de l'extraction. Le choix de la filtration plutôt que de la centrifugation dans le but de récolter les cellules du milieu de culture peut s'expliquer comme suit : alors que la filtration suivie de congélation immédiate à l'azote liquide ne prend qu'une fraction de seconde, la centrifugation, quant à elle, s'étale sur un laps de temps plus important. De ce fait, il est préférable d'éviter tout stress supplémentaire aux cellules en les congelant le plus rapidement possible dans l'azote liquide.

Deux paramètres importants seront vérifiés après extraction : la pureté et l'intégrité de nos ARN totaux. La pureté de l'ARN peut être estimée en calculant le rapport de l'absorbance à 260 nm (longueur d'onde absorbée par les acides nucléiques) et à 280 nm (longueur d'onde absorbée par les protéines). Théoriquement, ce rapport est égal à deux pour un acide nucléique pur. Cependant, des valeurs supérieures ou égales à 1,6 restent tout à fait acceptables. L'intégrité sera, quant à elle, vérifiée par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose. Un calcul de concentration permettra par la suite de déterminer la quantité d'ARN totale nécessaire à l'étape suivante : la synthèse d'ADNc.

La seconde étape est, comme mentionné plus haut, la synthèse d'ADNc double brin à partir de nos ARN totaux extraits précédemment (Figure 1C). Le procédé mis en œuvre par le kit utilisé (cDNA Synthesis System (Roche® réf. 1 117 831)) se déroule en trois étapes: la première consiste à enrichir l'échantillon en ARN messagers par l'utilisation d'amorces poly dT et à synthétiser le premier brin d'ADNc via une reverse transcriptase ; la seconde, consiste à synthétiser le second brin d'ADNc sous l'action d'une T₄ DNA polymérase, une étape intermédiaire permettant la dégradation des acides ribonucléiques résiduels et des protéines via une RNAase I et une protéinase K respectivement. Et pour finir, la dernière étape consiste à isoler les ADNc synthétisés. Une vérification de la présence de nos ADNc est réalisée par amplification du matériel néo-synthétisé avec des amorces amplifiant le gène de la tubuline, considéré comme étant un HKG (House Keeping Gene) et dont on attend que l'expression ne varie pas d'une condition à l'autre.

Une fois la synthèse d'ADNc réalisée, la première étape proprement dite de l'AFLP-ADNc peut être engagée. Il s'agit de la restriction de l'ADNc et de la ligation d'adaptateurs spécifiques aux extrémités des produits de restriction (Figure 1D). Dans la littérature, de nombreux couples d'amorce sont proposés : ApoI et MseI (Zhang et al., 2003 ; Durrant et al., 2000), AseI et TaqI (Goupil et al., 2003), Sau3AI et NcoI (Eckey et al., 2004), EcoRI et MseI (Simões-Araújo et al., 2002) Taq I et MspI (Zheng et al., 2004). Le couple EcoRI/MseI étant déjà utilisé au laboratoire pour l'étude AFLP des marqueurs moléculaires chez la chicorée, notre choix se porte donc sur ces deux enzymes. Notons que ces différents couples d'amorces ont un dénominateur commun : une des enzymes clive fréquemment (MseI, MspI, TaqI,...) tandis que l'autre clive plus rarement (EcoRI, ApoI, AseI,...). L'étape de restriction-ligation génère donc des fragments d'ADNc augmentés de deux adaptateurs à chacune de leurs extrémités. Ces fragments sont également appelés des TDF (fragments dérivés de transcrits).

La quatrième étape de l'AFLP-ADNc est celle de l'amplification préselective de nos fragments issus de l'étape de restriction-ligation (Figure 1E). Cette amplification a pour but d'enrichir l'échantillon en TDF en les amplifiant par PCR via des amorces complémentaires des adaptateurs liés à ces TDF.

Une nouvelle amplification constitue la cinquième étape de cette technique. Cette amplification se nomme « amplification sélective » (Figure 1F). Son nom lui vient du fait qu'elle est réalisée à partir des produits d'amplification préselective via des amorces complémentaires des adaptateurs mais augmentée d'une base supplémentaire (A,T,G ou C). Notons également que l'amorce EcoRI porte une molécule fluorescente à son extrémité 5' en vue de l'identification des différents fragments. Le protocole original de Bachem *et al.* (1998) préconise l'utilisation de deux bases supplémentaires. Nous nous sommes cantonnés à une seule base dans le but d'augmenter nos chances d'amplifier des TDF.

La dernière étape consiste à visualiser les différents TDF isolés. Pour cela, une séparation des fragments suivant leur taille est réalisée par électrophorèse capillaire et la détection des fragments a lieu quand ces derniers passeront devant un faisceau laser qui détectera les fluorochromes portés par les TDF (Figure 1G). L'étape suivante est bien entendu de comparer les sorties issues des échantillons contrôles et des échantillons élicités et de déterminer, dans la mesure du possible, des pics différentiellement présents dans telle ou telle condition.

3.2. Isolement des ARN totaux des cellules traitées et non traitées

L'isolement de l'ARN total a été réalisé en utilisant le réactif TriPure™ à partir de cellules traitées et non traitées aux oligogalacturonides. La qualité de l'ARN total a été estimée par dosage au spectrophotomètre et par électrophorèse sur gel d'agarose.

Les valeurs obtenues pour l'estimation de la pureté sont comprises entre 1,610 et 2,063 avec une valeur moyenne de 1,84. Ces résultats indiquent que notre ARN total est relativement pur et peut donc être utilisé pour les étapes ultérieures.

La vérification de l'intégrité de nos ARN totaux est réalisée en faisant migrer 2 µl de chaque échantillon d'ARN total sur un gel d'agarose 2 % (figure 2). L'analyse du gel permet de distinguer trois bandes caractéristiques : la bande de plus haut poids moléculaire correspond à l'ARN ribosomal 28S suivie immédiatement de la bande représentant l'ARN ribosomal 18S. La dernière bande, quant à elle, correspond à de l'ARN ribosomal 5S. Bien que cette dernière bande puisse paraître très importante, signalons que les bandes 28S et 18S sont bien présentes et émettent également une fluorescence importante. Ceci pourrait être dû au fait que le signal de fluorescence soit saturé. Nous pouvons donc considérer que notre ARN total est de bonne qualité.

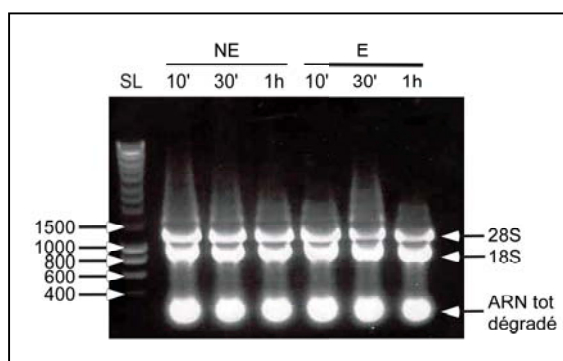


Figure 2 : Vérification de l'intégrité de l'ARN total des cellules d'*Arabidopsis thaliana* par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %. NE, Non élicité ; E, élicité ; SL, Smart Ladder.

3.3. Synthèse d'ADNc double brin

Dans un premier temps, nous étudions les réponses de défense de nos cellules, tout temps de prélèvements confondus. Cette démarche nous permet, en une seule étape, de compiler un grand nombre d'ARN messagers ayant des cinétiques différentes. En d'autres termes, nous allons regrouper les ARN totaux des temps 10 minutes, 30 minutes et 1 heure et effectuer la synthèse d'ADNc double brin sur ce mélange. Seront donc présents dans notre échantillon des ARN messagers transcrits rapidement et possédant un taux de dégradation élevé mais également des ARN messagers produits plus tardivement en réponse à l'élicitation. Il sera donc question, dans un premier temps, de mettre le doigt sur un ou des gènes spécifiques des réponses de défenses, quelle que soit la durée de stimulation. Cette opération est bien entendu réalisée à la fois sur les ARN totaux « élicités » et « non élicités ».

Afin de constituer les deux groupes d'ARN totaux, nous allons prélever dans chacun des échantillons indépendants (10', 30' et 1h) appartenant à une condition (traité ou non traité), un volume de solution contenant 15 µg d'ARN total. De ces deux nouveaux échantillons contenant 45 µg d'ARN total chacun, est prélevé un volume de solution contenant, lui aussi 15 µg d'ARN total. Ce sont ces ARN totaux qui serviront de matrice pour la synthèse d'ADNc double brin. En effet, le kit cDNA Synthesis System (Roche® réf. 1 117 831) préconise l'utilisation d'une quantité d'ARN totaux comprise entre 1 et 20 µg.

Les deux culots d'ADNc obtenus étant indétectables à l'œil nu, une vérification de la présence de ce matériel est réalisée par amplification d'un µg d'ADNc via des amorces amplifiant le gène de la tubuline, gène dont on sait que la transcription ne varie pas d'une condition à l'autre. On parle d'ailleurs de gène HKG (House Keeping Gene). On s'attend donc à ce que l'ARNm de ce gène et donc son ADNc correspondant soient présents dans les deux échantillons (élicité et non élicité). Les amorces utilisées permettent l'amplification d'un segment d'ADN de 742 pb. Les produits d'amplification sont analysés sur gel d'agarose 2% (Figure 3).

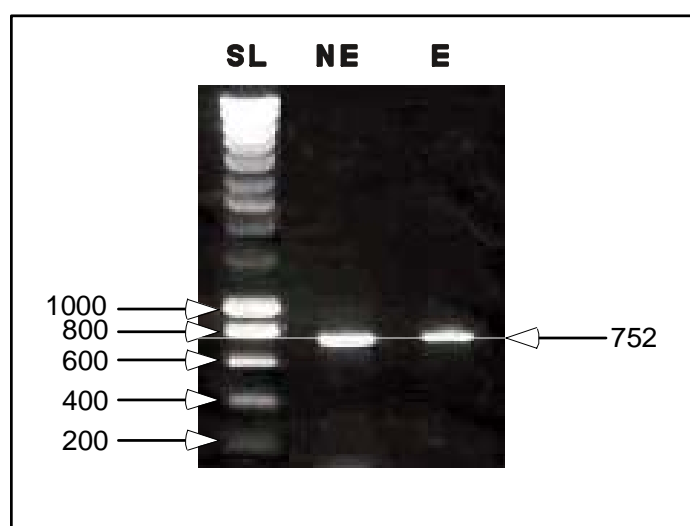


Figure 3 : Vérification de la synthèse d'ADNc par amplification PCR via des amorces amplifiant la tubuline. Le fragment amplifié par ces amorces mesure 752 pb. Ne, Non élicité ; E, élicité ; SL, Smart Ladder

3.4. AFLP-ADNc

3.4.1. Amplification sélective : mise au point

Comme mentionné plus haut, lors de cette amplification sélective, les deux amorces complémentaires des adaptateurs fixés aux fragments d'ADNc sont augmentées d'une base supplémentaire. Nous avons donc tester les différentes combinaisons possibles de couples d'amorces afin d'écarter les couples ne donnant pas de sorties exploitables. Les amorces E01, E02, E03 et E04 sont donc couplées aux amorces M01, M02, M03 et M04 de telle sorte que toutes les combinaisons possibles soient représentées (tableau 1).

E01 – M01	E02 – M01	E03 – M01	E04 – M01
E01 – M02	E02 – M02	E03 – M02	E04 – M02
E01 – M03	E02 – M03	E03 – M03	E04 – M03
E01 – M04	E02 – M04	E03 – M04	E04 – M04

Tableau 1 : Combinaisons possibles de couplage des amorces E0x – M0x (x = 1 à 4).

Afin d'effectuer ce test préliminaire, une AFLP est réalisée sur l'ADNc de cellules en suspension d'*Arabidopsis thaliana* non traitées. Ces cellules proviennent d'une culture de 7 jours dans un milieu MSMO et de trois jours dans un milieu d'élicitation. Après ces trois derniers jours, une extraction d'ARN total suivie d'une synthèse d'ADNc sont réalisées.

Les différentes sorties AFLP-ADNc sont analysées suivant 4 critères : nombre de pics présents sur le graphique, régularité de la ligne de base, individualisation des pics et enfin, reproductibilité. Le nombre de pic est un critère majeur puisque, au plus ce dernier sera grand, au plus nos chances d'isoler un fragment différentiellement présent seront importantes. Le critère « individualisation » interviendra par la suite pour le clonage des fragments obtenus. En effet, plus un pic est isolé des autres, plus la probabilité de retrouver le clone correspondant au fragment désigné par ce pic est élevée.

L'analyse des différentes sorties AFLP a donc permis d'évincer un certain nombre de couples d'amorces. Par exemple, toutes les sorties impliquant l'amorce E03 présentent étrangement un même pic à 221 nucléotides (Figure 4). Ce pic ne devrait pourtant se trouver au plus que dans une seule des quatre sorties puisque ces amorces sont censées amplifier des fragments différents. Ceci signifierait que le fragment duquel est issu le pic devrait donc commencer par A, T, G et C. Ceci est bien entendu impossible. Cette observation spécifique à l'amorce E03 nous a donc conduit à éliminer cette série de graphiques.

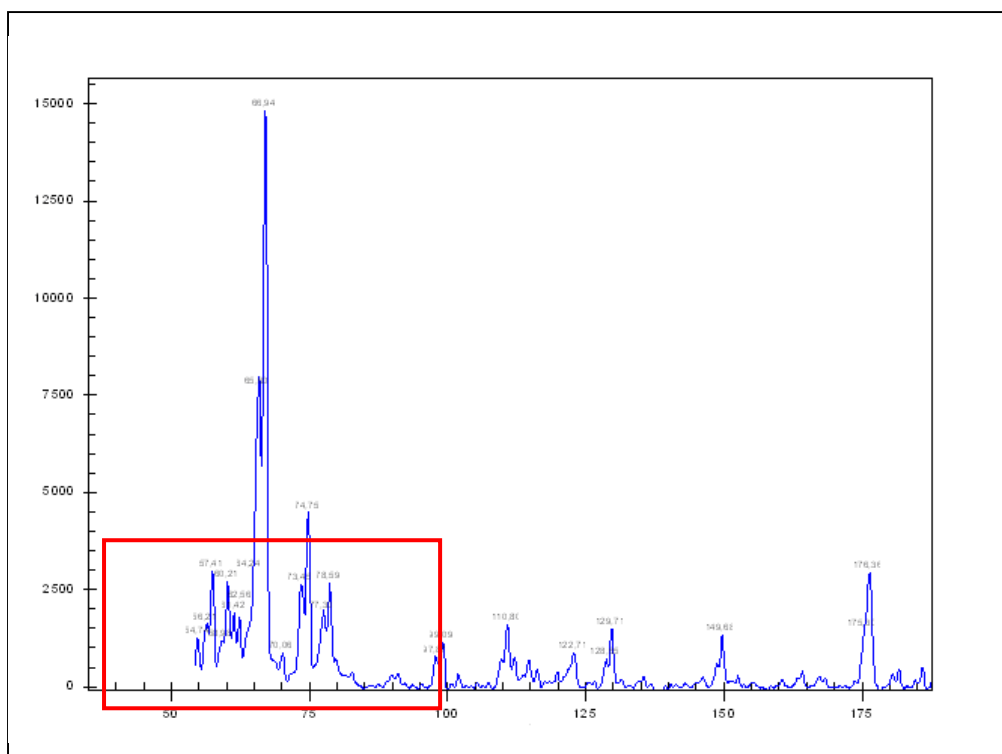


Figure 5. Sorties obtenues après une AFLP sur ADNc de cellules non élicitées ayant passé sept jours dans un milieu classique MSMO suivis de trois jours dans le milieu d'élicitation. Cette sortie a été obtenue après utilisation de la paire d'amorces E01-M04 pour la réalisation de l'amplification sélective. Le cadre rouge indique une portion de la sortie présentant une ligne de base trop élevée pour permettre une utilisation de ce couple d'amorce lors du test d'élicitation. L'axe des abscisses représente en pb la taille des fragments identifiés et l'axe des ordonnées donne une intensité de fluorescence émise par le fluorochrome porté par l'amorce E01.

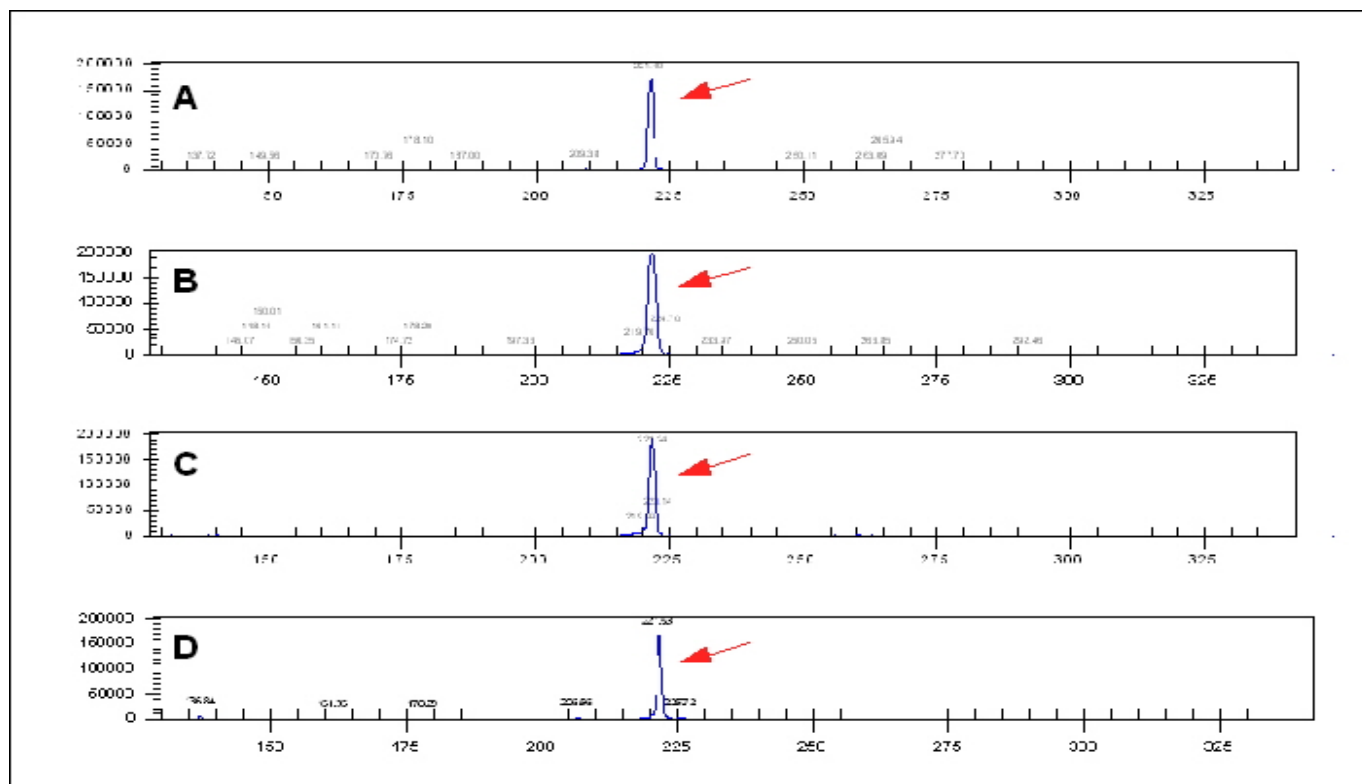


Figure 4 : Sorties obtenues après une AFLP-ADNC de cellules non élicitées ayant passé sept jours dans un milieu classique MSMO suivis de trois jours dans le milieu d'élicitation. Les sorties ont été générées par utilisation des couples d'amorces E03-M01 (A), E03-M02 (B), E03-M03 (C) et E03-M04 (D). La flèche rouge indique un pic correspondant à un fragment de 221 pb. Ce pic se retrouve étrangement dans chacune des quatre sorties obtenues. L'axe des abscisses représente en pb la taille des fragments identifiés et l'axe des ordonnées représente une intensité de fluorescence émise par le fluorochrome porté par l'amorce E03.

Certains couples d'amorces ont été éliminés de la sélection car ils généraient des sorties présentant une ligne de base non régulière (Figure 5). Cette irrégularité ne permet pas de distinguer de façon précise des pics ayant une intensité de fluorescence peu élevée. Ce problème pourrait nous faire passer à côté de ces pics et de ce fait, réduire notre champ d'investigation des fragments différenciellement présents.

Enfin, des couples d'amorces ne présentaient que des pics en nombre réduit et de faible intensité de fluorescence. Des sorties restantes, nous avons décidé de ne garder que les suivantes : E01-M03, E02-M02, E02-M04 et E04-M04 (Figure 6). Les trois premiers couples d'amorces généraient des sorties répondant à tous nos critères de sélection tandis que le quatrième couple, E04-M04 a été sélectionné parce qu'il générerait des pics relativement distants les uns des autres. Le caractère d'individualisation des pics y était bien représenté. Ce sont ces couples qui seront utilisés pour les tests d'élicitation ultérieurs.

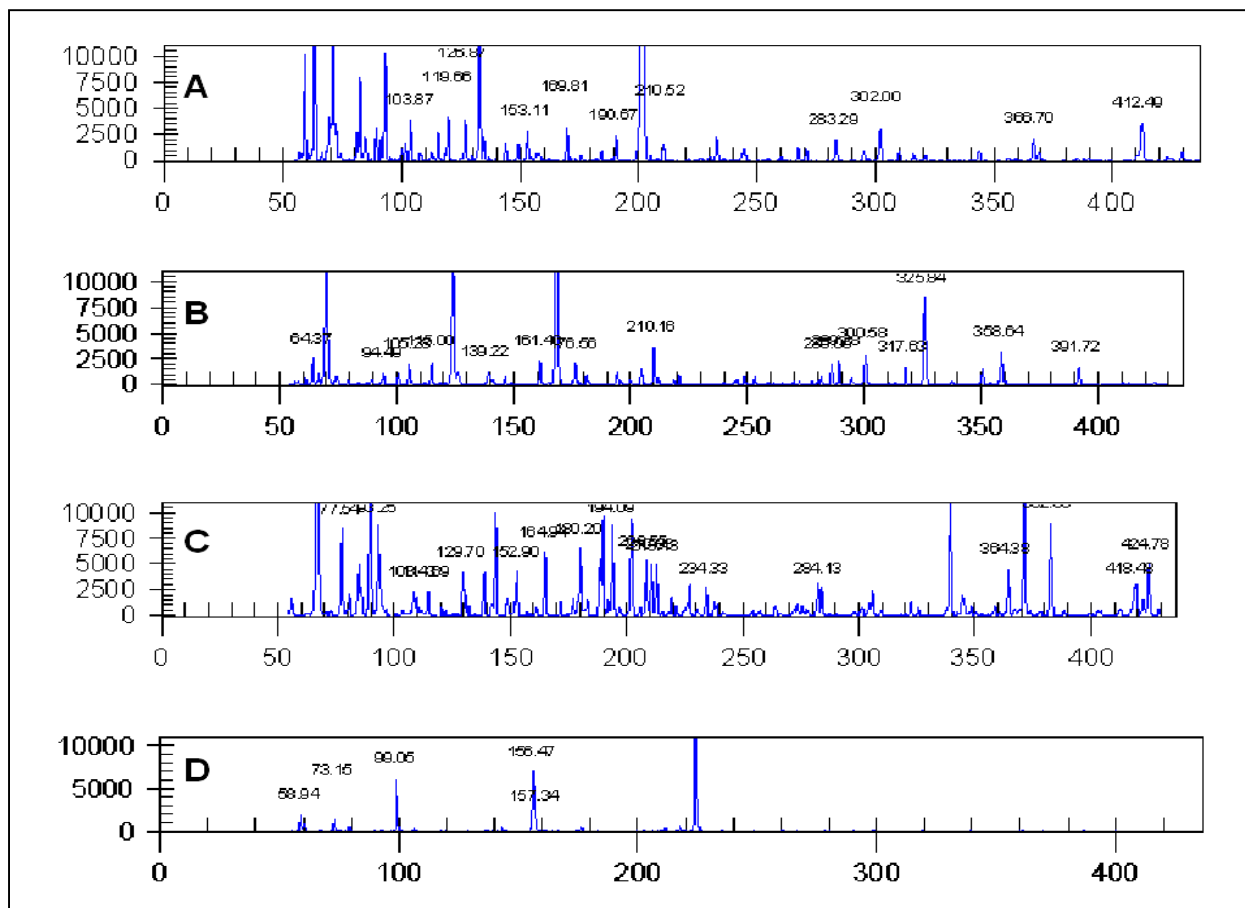


Figure 6 : Sorties d' AFLP-ADNc répondant aux différents critères de sélection utilisés (nombre de pics présents sur le graphique, régularité de la ligne de base, individualisation des pics et enfin, reproductibilité). Les sorties ont été générées par utilisation des couples d'amorces E01-M03 (A), E02-M02 (B), E02-M04 (C) et E04-M04 (D). Bien que ne possédant pas de nombreux pics, la dernière sortie (E04-M04) a été retenue car elle présentait des pics bien individualisés. L'axe des abscisses représente en pb la taille des fragments identifiés et l'axe des ordonnées représente une intensité de fluorescence émise par le fluorochrome porté par l'amorce E0x (x = 1,2 ou 4).

Signalons enfin que les quatre sorties sélectionnées, comme toutes les autres d'ailleurs, sont parfaitement reproductibles. En effet, deux expériences indépendantes utilisant les mêmes couples d'amorces génèrent des sorties identiques. Les mêmes pics sont présents aux mêmes endroits (Figure 7 voir ci-contre).

3.4.2. Identification de pics différenciellement présents

Une nouvelle AFLP est réalisée cette fois sur les ADNc en provenance de cellules traitées aux oligogalacturonides. Un contrôle est également réalisé en effectuant le même test sur des cellules non traitées. L'amplification sélective est effectuée à l'aide des amorces déterminées précédemment, et les sorties des échantillons « élicités » et « non élicités » sont comparées deux à deux par couples d'amorces. Pratiquement, le programme informatique va superposer les deux graphiques (« élicité » et « non-élicité ») et les différences de profil seront recherchées manuellement en passant en revue tous les pics de la sortie. La présence d'un pic dans une sortie obtenue avec l'échantillon « élicité » et l'absence du pic correspondant dans la sortie obtenue avec l'échantillon « non –élicité » signifient que le gène dont est issu l'ARN

messager est induit lors de la stimulation. La réciproque, par contre, signifie que le gène est réprimé en réponse au traitement appliqué aux cellules.

Les quatre graphiques présentant les pics des conditions « traité » et « non traité » superposés sont analysés. De ces quatre sorties, seule celle obtenue avec le couple d'amorces E04-M04 présentait des pics différenciellement présents (Figure 8). Ces pics, au nombre de deux se situent au alentour de **150** et **614** nucléotides (Figure 9) et correspondraient à des gènes réprimés puisqu'ils sont présents dans la sortie «non-élicité» et absents dans la sortie « élicité ». Il est intéressant de signaler que l'intensité des pics de la sortie « non élicité » est en moyenne deux à trois fois plus faible que celle des pics de la sortie « élicitée ». Ceci est du à une variabilité expérimentale et n'interfère en rien avec notre interprétation des données. De plus, la technique n'étant pas quantitative (car basée sur des amplifications PCR au plateau), l'intensité de fluorescence ne peut en aucun cas indiquer qu'un gène, dans une des deux conditions est plus ou moins exprimé que le gène correspondant dans l'autre condition. Cependant, une intensité de fluorescence élevée s'explique par le fait que le laser a détecté en sortie de capillaire une grande quantité de fluorochromes et donc une grande quantité d'un même fragment portant cette molécule fluorescente. Comment donc expliquer que les pics n'ont pas tous la même intensité de fluorescence ? Il se pourrait que la quantité de transcrits de départ puisse jouer un rôle : une grande quantité de départ générerait un pic d'intensité élevée et inversement, une faible quantité de départ génèrerait un pic de faible intensité. Le plateau de la PCR ne serait donc pas atteint pour tous les fragments en fin d'amplification. Avec toute les réserves que cela impose, il serait possible, au départ de la technique AFLP-ADNc associée à la détection de fluorescence après électrophorèse capillaire, d'apprécier une différence du taux de transcrits au sein d'un même échantillon.

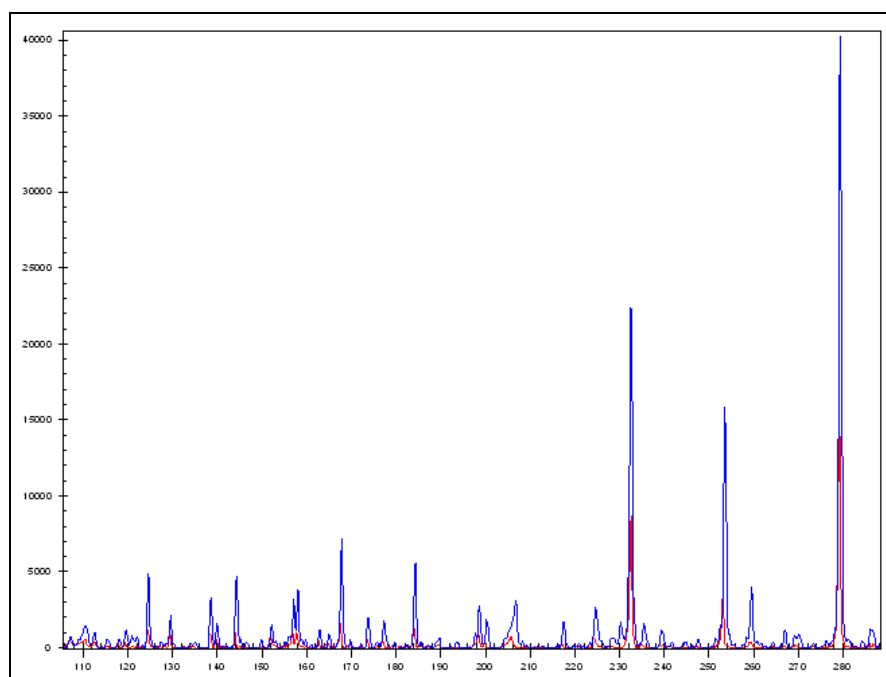


Figure 8 : Ce graphique représente la superposition des deux sorties d'AFLP-ADNc : « élicitée » (rouge) et « non élicitée » (bleu). Ces sorties ont été obtenues après une AFLP-ADNc utilisant la paire d'amorces marquée E04-M04. L'axe des abscisses représente en pb la taille des fragments identifiés et l'axe des ordonnées représente une intensité de fluorescence émise par le fluorochrome porté par l'amorce E04.

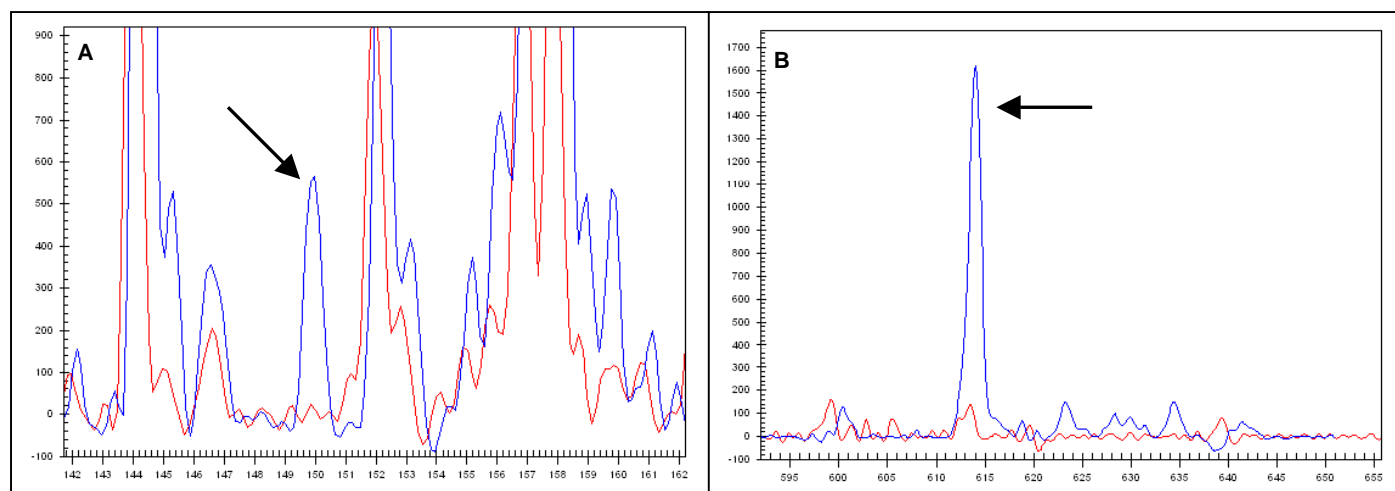


Figure 9 : Cette figure représente les deux zones de la sortie AFLP-ADNc (obtenue par utilisation des amorces E04-M04) indiquant les deux pics correspondant aux fragments de 150 pb (**A**) et de 614 pb (**B**). Ces deux pics, correspondraient à des ARNm provenant de gènes subissant une répression transcriptionnelle lors d'un traitement aux oligogalacturonides. En effet, ces deux pics sont présents dans la sortie correspondant aux cellules non traitées (tracé bleu) et absents de la sortie correspondant aux cellules traitées (tracé rouge). L'axe des abscisses représente en pb la taille des fragments identifiés et l'axe des ordonnées représente une intensité de fluorescence émise par le fluorochrome porté par l'amorce E04.

4. Clonage des fragments d'intérêt

4.1. Introduction

La technique de clonage des fragments identifiés comme étant issus de gènes différentiellement exprimés est basée sur une méthode mise au point par Tamborind guy et ses collègues (Tamborind guy et *al.*, 2004). Cette méthode préconise le clonage en masse des produits d'amplification sélective suivi d'un criblage des colonies recombinantes. Cela a pour but d'isoler les fragments d'intérêt afin de pouvoir les séquencer (Figure 10 voir ci-contre). Cependant, contrairement au travail de ces auteurs qui utilisaient des fragments marqués radioactivement pour leur analyse sur gel d'électrophorèse de type SDS-PAGE, nous utilisons comme moyen d'identification de ces fragments clonés, une migration par électrophorèse capillaire suivie d'une détection laser des fluorochromes que portent les fragments d'ADNc.

4.2 Clonage direct des fragments marqués

Dans un premier temps, nous avons tenté de cloner directement le produit d'amplification sélective dans le vecteur pCR II. Sachant que nos fragments d'intérêts proviennent de l'échantillon « non élicité » ayant subi une amplification sélective avec le couple d'amorce E04-M04, le produit d'amplification de cet échantillon a été purifié sur colonne Microcon. Trois  l et six  l de ce produit purifié ont ensuite été prélevés afin de réaliser deux ligations. En effet, une formule permet de calculer la quantité de produit PCR à

ajouter aux autres réactifs de la ligation afin que cette dernière soit optimale. Cette formule (Figure 11) se base sur le fait que le produit PCR en question est de taille connue. Cependant, notre échantillon contient des fragments de taille très hétérogène (de 50 à 650 pb). De ce fait, il est impossible de déterminer avec précision la quantité d'ADN à ajouter à la réaction de ligation. Nous avons donc choisi de travailler avec deux quantités différentes de produit de purification afin d'augmenter la gamme des fragments clonables.

$$X \text{ ng de produit PCR} = \frac{(Y \text{ pb du produit PCR}) (50 \text{ ng du vecteur pCRII})}{3900 \text{ pb (taille du vecteur pCRII)}}$$

Figure 11: Formule permettant de calculer la quantité de produit PCR à ajouter aux autres réactifs de la ligation afin que cette dernière soit optimale.

Après clonage et transformation des bactéries, celles-ci sont incubées une nuit à 37°C. Pendant cette période, une double sélection va s'opérer : la première s'effectue sur milieu contenant un antibiotique (la kanamycine). Les bactéries non transformées ne posséderont pas le gène de résistance à l'antibiotique. La deuxième sélection déterminera les bactéries ayant un vecteur contenant un insert. Le principe de cette sélection est expliqué au point 4.7.3 du chapitre matériel et méthode.

Aucune bactérie n'a été observée au terme d'une nuit d'incubation à 37°C. Une explication possible est que le fluorochrome porté par les fragments du produit d'amplification sélective interfère avec le processus de ligation et donc de transformation des bactéries TOP 10 F'. Un encombrement stérique causé par cette molécule fluorescente pourrait empêcher le vecteur de se linéariser et de ce fait, la transformation ne pourrait avoir lieu.

Afin de contourner cet obstacle, le produit d'amplification présélective de l'échantillon « non –élicité » est amplifié avec les amorces sélectives non marquées E04-M04.

4.3. Clonage des fragments non marqués

4.3.1. Amplification du produit d'amplification présélective

Des amorces non marquées sont utilisées afin d'éviter tout problèmes lié au fluorochrome lors de l'insertion des fragments dans le plasmide pCR II. Le protocole utilisé est rigoureusement identique à celui de l'amplification sélective avec les amorces marquées. Seul le couple E04 – M04 est utilisé. Cette étape est réalisée sur l'échantillon provenant des cellules non élicitées. La réaction est réalisée pour un volume final de 100 µl.

4.3.2. Purification du produit d'amplification sélective

Afin d'éliminer de l'échantillon les nucléotides et les amorces résiduels, une purification du produit d'amplification sélective est effectuée. Quatre-vingt µl de ce produit sont donc passés sur une colonne du kit Microcon Centrifugal Devices (millipore). Les fragments ainsi purifiés sont resuspendus dans 40 µl d'eau stérile.

Une migration sur gel d'agarose 2% est ensuite réalisée afin de s'assurer qu'aucune perte de fragments ne s'est produite suite à cette purification. Vingt μl du produit d'amplification sélective avant purification et vingt μl de ce même produit après amplification sont déposés sur le gel (Figure 12).

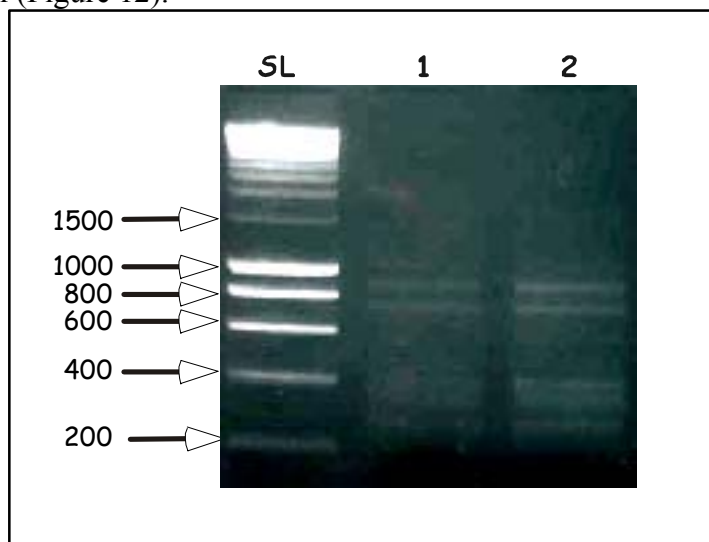


Figure12 : Comparaison du produit d'amplification avant (1) et après (2) purification. 20 μl de ces produits ont été déposés sur un gel d'agarose 2%. Bien que les deux profils présentent une différence d'intensité, l'allure générale est identique. Ceci suggère qu'aucun fragment n'a été perdu lors de la purification

L'allure générale des deux migrations étant semblable, nous pouvons conclure que la purification n'a pas conduit à la perte de fragments. La plus faible intensité des bandes du produit d'amplification sélective avant purification par rapport à celle des bandes obtenues après purification, peut s'expliquer par le fait que l'échantillon purifié est plus concentré que l'échantillon non purifié. Il est donc normal que les bandes de l'échantillon purifié paraissent plus intenses. Signalons encore qu'aucune bande inférieure à 200 pb n'apparaît sur le gel aussi bien pour l'échantillon purifié que pour l'échantillon non purifié. Une explication probable est, qu'étant en quantité relativement faible, ces fragments ne sont pas détectés sur le gel. Nous ne pouvons donc pas nous prononcer sur la présence ou l'absence de ces fragments ayant une taille inférieure à 200 pb, et notamment celui de 150 pb.

4.3.3. Criblage des colonies

Du produit d'amplification sélective, nous avons prélevé 3 μl et 6 μl afin de réaliser la ligation dans le vecteur de transformation pCR II. Les raisons pour lesquelles nous avons choisi ces deux quantités sont exposées au point 4.2. du chapitre résultats et discussion.

L'étape suivante consiste à transformer les bactéries compétentes TOP 10 F' avec les vecteurs portant l'insert obtenu lors de l'étape précédente. Pour ce faire, 2 μl du produit de ligation est ajouté aux cellules et un choc thermique est réalisé pendant 30 secondes à 42°C.

Les bactéries transformées sont étalées ensuite sur un milieu sélectif (kanamycine) contenant du X-Gal et de l'IPTG. Trois volumes différents seront étalés : 50 μl , 75 μl et 100 μl . Cette précaution nous permettra soit d'éviter que des colonies poussant trop vite ne

confluent, soit d'obtenir un nombre de colonies exploitable même si les bactéries ne poussent pas vite.

Un test de viabilité est également réalisé en étalant des bactéries transformées sur un milieu ne contenant pas d'antibiotique.

Après une incubation d'une nuit à 37°C, nous observons sur toutes les boîtes de culture, de nombreuses colonies blanches, signe qu'elles ont bien été transformées par un vecteur possédant un insert. Le test de viabilité est bien entendu positif.

Afin de cribler ces colonies blanches et de déterminer la taille approximative des inserts portés par les vecteurs pCR II, une amplification PCR de ces vecteurs est réalisée à l'aide des amorces universelles *forward* *reverse*. Cette amplification sera suivie d'une migration du produit PCR sur gel d'agarose 2%. Pour ce faire, 96 colonies blanches seront prélevées de la boîte de culture via un embout stérile. Ces clones seront repiqués sur un nouveau milieu sélectif avec antibiotique mais sans X-Gal et sans IPTG. L'embout ayant servi à ce repiquage sera ensuite plongé dans 10 µl du mélange PCR. Les résultats de cette amplification sont présentés à la Figure 13 (voir ci-contre).

Signalons que lors de l'analyse des différents gels obtenus, il faut soustraire 242 pb à chacune des bandes obtenues sur le gel afin de connaître la taille exacte des inserts amplifiés. En effet, les amorces *forward* et *reverse* s'hybrident en dehors de la zone d'insertion des TDF dans le vecteur. Elles amplifient donc un fragment de taille supérieure à celle de l'insert.

La piste 59 présente deux bandes bien distinctes. Ceci est problématique puisque l'amplification est réalisée normalement sur un seul clone bactérien ne portant qu'un seul plasmide et donc un insert unique. Ce fait pourrait s'expliquer comme suit : lors du prélèvement des colonies pour la PCR, un embout contaminé avec des bactéries provenant d'une colonie a été utilisé une deuxième fois pour prélever une autre colonie. Dès lors, la PCR a amplifié deux inserts différents. Une deuxième PCR fut donc réalisée sur la colonie 59 afin de vérifier notre hypothèse. Grâce à cette seconde PCR, nous pouvons exclure la bande de plus faible poids moléculaire présente à la piste 59 de la Figure 13. En effet, cette deuxième PCR a amplifié un fragment de plus ou moins 600 pb.

Les pistes 12, 24, 48, 72, 80 et 83 ne présentent aucune bande. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'il y aurait eu un effet inhibiteur sur la PCR de part une trop grande quantité de bactéries ajoutée au mélange d'amplification ou encore parce qu'aucune bactérie ne fut ajoutée à ce mélange (mauvais prélèvement).

4.4. Validation de la technique

Dans un premier temps, nous allons sélectionner sur la sortie « AFLP-ADNc » des pics d'intensité de fluorescence élevée. La taille des fragments correspondants à ces pics sera relevée afin de passer en revue les différents gels obtenus après migration du produit PCR avec les amorces *forward* et *reverse* (Figure 13) et d'identifier toutes les bandes dont la taille se situe aux environs des tailles relevées et augmentées de 242 pb. Une fois identifiés, ces clones sont amplifiés via le couple d'amorce E04 - M04 marqué d'un fluorochrome. Le produit d'amplification résultant est ensuite analysé par électrophorèse capillaire. Ce processus permettra ainsi de déterminer très précisément la taille de l'insert.

4.4.1. Sélection de pics en vue du criblage

Nous passons en revue le chromatogramme correspondant à la sortie de l'échantillon « non élicité » ayant été amplifié sélectivement par le couple d'amorce E04-M04, dans le but de sélectionner des pics d'intensité importante et se trouvant dans une zone s'étalant sur 200 pb. La raison de ce choix est principalement d'ordre pratique. Il est en effet plus facile de distinguer quelques grands pics parmi de nombreux autres petits. De plus, le fait de sélectionner une zone d'approximativement 200 pb va nous permettre de limiter notre champ d'investigation lors du criblage des gels obtenus après migration du produit PCR avec les amorces *forward* et *reverse* (Figure 13).

Les pics retenus pour cette étude correspondent à des fragments de 279 pb, 337 pb et enfin 404 pb approximativement (Figure 14).

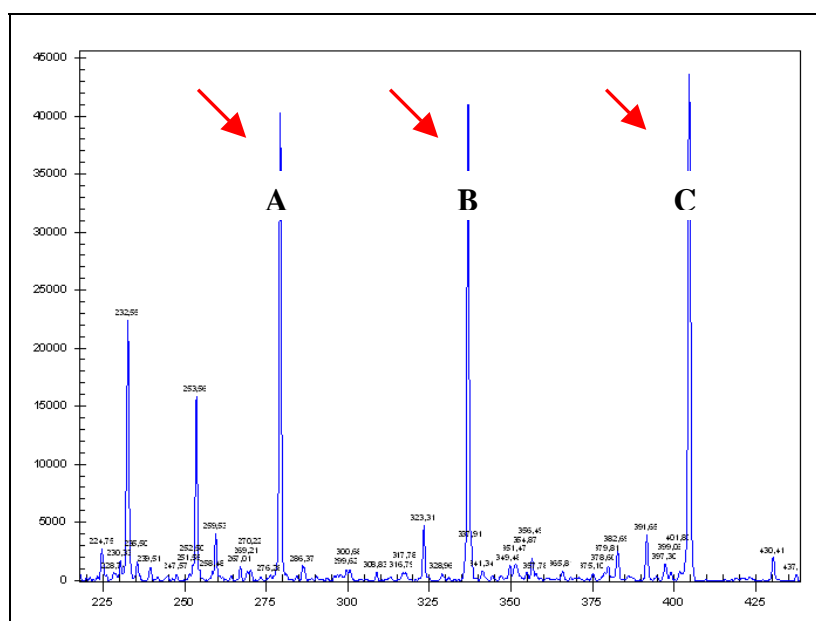


Figure 14 : Sortie d'AFLP sur ADNc obtenue via le couple d'amorces marqué E04-M04. Cette sortie reprend les TDF issus de l'AFLP réalisée sur ADNc de cellules non traitées (contrôle). Les 3 flèches indiquent les pics correspondant aux fragments retenus pour l'expérience de validation de la technique de l'AFLP-ADNc. L'axe des abscisses représente en pb la taille des fragments identifiés et l'axe des ordonnées représente une intensité de fluorescence émise par le fluorochrome porté par l'amorce E04.

4.4.2. Recherche des clones correspondant aux fragments sélectionnés

Nous allons passer en revue les différents gels obtenus après migration du produit PCR avec les amorces *forward* et *reverse* (Figure 13) afin d'identifier toutes les bandes dont la taille se situe entre 500 et 700 pb. Cette fourchette de 200 pb va nous permettre d'isoler des TDF d'une taille comprise entre 258 (500 – 242) et 458 pb (700 – 242). Comme mentionné plus haut, ces 242 pb supplémentaires proviennent du fait que les amorces *forward* et *reverse* sont conçues pour s'hybrider en dehors du site d'insertion du fragment dans le plasmide.

Parmi les 96 colonies testées, 15 apparaissent comme étant potentiellement porteuses des inserts correspondant aux fragments déterminés précédemment. En effet, les colonies **5, 14, 21, 26, 32, 52, 60, 62, 68, 71, 74, 78, 87, 94 et 96** présentent un fragment de taille

comprise entre 500 et 700 pb, lorsqu'elles sont amplifiées par les deux amorces universelles *forward* et *reverse* (flèches blanches de la Figure 13).

4.4.3. Détermination précise de la taille des inserts

Une amplification sélective sur les colonies isolées lors de l'étape précédente est réalisée via le couple d'amorce E04-M04 marqué d'un fluorochrome porté par l'amorce E04). Le produit d'amplification résultant est ensuite analysé par électrophorèse capillaire et les fragments marqués et amplifiés sont détectés en sortie du capillaire par un laser. Ce processus permet ainsi de déterminer très précisément la taille des inserts.

Après analyse des différentes sorties obtenues lors de ce test et comparaison de ces dernières avec la sortie générale de l'AFLP-ADNc de cellules non traitées (avec utilisation du couple d'amorces E04-M04), il a été possible d'isoler un clone, le n°26, portant l'insert correspondant à un des trois pics sélectionnés, celui représentant le fragment de 404 pb.

La Figure 15 (voir ci-contre) montre une superposition de la sortie correspondant à l'amplification de l'insert du clone 26 et de celle correspondant à la sortie générale. Il est intéressant de mentionner le fait que le pic représentant l'insert de la colonie 26 présente deux « têtes » distantes chacune d'environ 1 pb (Figure 16). Ceci peut être dû à une propriété particulière de la polymérase se trouvant dans le Core Mix (mélange d'amplification utilisé lors de l'amplification sélective). Cette enzyme, la Taq polymérase, et possède la particularité d'ajouter une adénine à la fin du brin en élongation. Cette deuxième « tête » représente donc une adénine supplémentaire ayant été ajoutée à la séquence amplifiée.

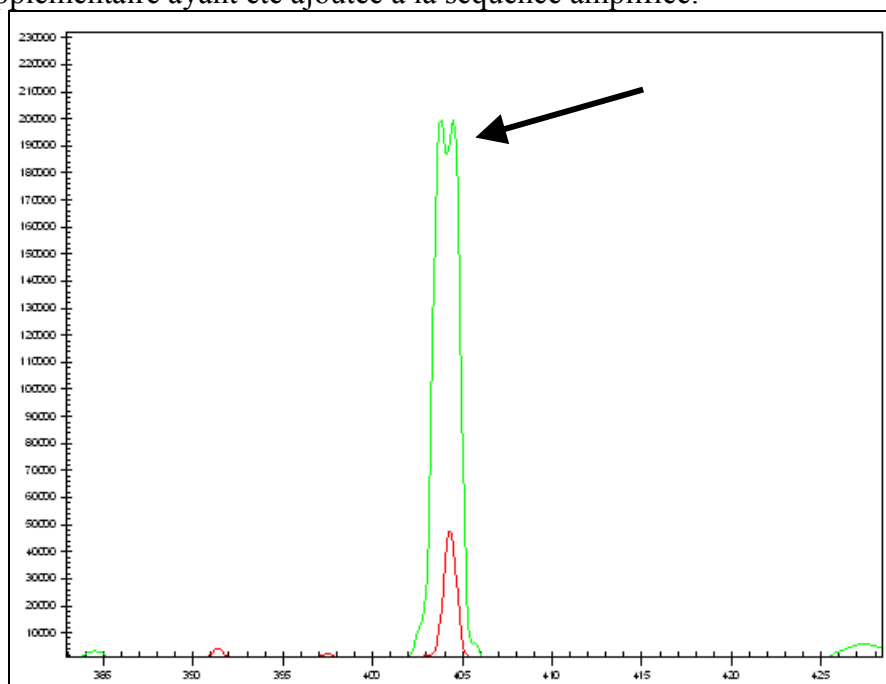


Figure 16 : Cette figure montre une vue rapprochée de la figure 15. Il est possible de distinguer le sommet à deux « pointes » (indiqué par la flèche) de la sortie obtenue par amplification de l'insert de la colonie 26 via le couple d'amorces marqué E04-M04. Ce dédoublement du sommet est dû probablement à une propriété particulière de la polymérase du Core Mix (mélange d'amplification utilisé lors de l'amplification sélective). Cette enzyme est la Taq polymérase et possède la particularité d'ajouter une adénine à la fin du brin en élongation. Cette deuxième « tête » représente donc les séquences ayant été augmentées d'une adénine terminale. La courbe verte représente la sortie obtenue après amplification de l'insert de la colonie 26, tandis que la courbe rouge représente une portion de la sortie obtenue après amplification sélective des fragments dérivés des ADNc des cellules non élicitées.

4.4.4. Séquençage de l'insert de la colonie 26

Bien que le fragment isolé et identifié ne soit ni induit ni réprimé suite à un traitement aux oligogalacturonides, il est intéressant de se renseigner sur la nature du fragment récupéré à partir de la colonie 26. Cette démarche permet également de monter l'aboutissement d'une technique particulière : l'AFLP-ADNc

Le séquençage du fragment de 404 pb a donc permis de caractériser le gène dont serait issu l'ARNm identifié par la technique de l'AFLP-ADNc. En effet, un blast x (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) a été effectué au départ de la séquence obtenue à partir du fragment. Ce type de blast permet une transcription *in silico* de la séquence. La protéine virtuelle issue de cette transcription est ensuite comparée à l'ensemble des protéines de la banque par alignement de séquence des acides aminés (tableau 2). Cet alignement suggère que le fragment récupéré à partir de la colonie 26 proviendrait de l'ARNm issu du gène codant pour la 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase (tableau 2). Cette enzyme fait partie de la famille des oxydoréductases agissant sur des groupements hydroxyles (CH-OH) et possédant le NADP⁺ ou le NAD⁺ comme accepteur d'électron. Elle intervient dans la voie de biosynthèse des acides gras.

Nom	Locus	N° accesion	aa	Score	E value
unknown protein [Arabidopsis thaliana]	AAM10053	AY081491.1	319 aa	213	4e-54
3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase [Arabidopsis thaliana].	CAA45794	X64464.1	319 aa	206	4e-52
protein F21J9.2 [imported] - Arabidopsis thaliana.	A86378	ND	308 aa	204	1e-51
3-oxyacyl-[acyl carrier protein] reductase [Brassica napus].	CAC41364	AJ243085.1	315 aa	196	4e-49
3-oxyacyl-[acyl carrier protein] reductase [Brassica napus]	CAC41363	AJ243084.1	328 aa	196	4e-49

Tableau 2 : Ce tableau indique les cinq premiers résultats obtenus après avoir effectué un blast x contre la séquence nucléotidique du TDF provenant de la colonie 26. Ces résultats laissent à penser que ce fragment provient de l'ARNm issu du gène codant pour la 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase, une enzyme intervenant dans la voie de biosynthèse des acides gras.

4.5. Tentative de détermination du pic à 614 pb

Avant toute chose, signalons que notre étude va se porter uniquement sur le pic à 614 pb. Ce pic est à première vue plus facilement identifiable sur gel que le pic à 150 pb. En effet, le pic à 614 pb se trouve beaucoup plus isolé des autres pics que celui à 150 pb. De ce fait, il sera normalement plus facile de retrouver un fragment isolé des autres qu'un fragment « noyé » dans une série d'autres fragments de taille très proche.

4.5.1. Recherche du clone d'intérêt

Notre démarche est la suivante : nous passerons en revue les différents gels obtenus après migration du produit PCR avec les amorces *forward reverse* (Figure 13) et tenterons d'identifier toutes les bandes dont la taille se situe aux environs de 850 pb. Une telle précision

ne pouvant être obtenue sur gel d'agarose, toutes les bandes comprises entre 800 et 1000 pb seront considérées comme intéressantes (flèches rouges de la Figure 13). En effet, l'amplification du fragment à 614 pb via les amorces universelles va générer une bande de 614 + 242 pb soit 856 pb.

Sept bandes comprises entre 800 et 1000 pb sont susceptibles de représenter notre fragment de 614 pb. Ces bandes proviennent de l'amplification des inserts en provenance des vecteurs des colonies suivantes : **7, 16, 22, 29, 35, 51 et 61**.

4.5.2. Détermination précise de la taille des inserts

Afin de déterminer de façon précise la taille des inserts portés par les vecteurs des sept colonies isolées précédemment, une amplification sélective sur ces bactéries est réalisée via le couple d'amorces E04 - M04 marqué d'un fluorochrome. Le produit d'amplification résultant est ensuite analysé par électrophorèse capillaire et le fragment marqué et amplifié est détecté en sortie du capillaire par un laser. Ce processus permet ainsi de déterminer très précisément la taille de l'insert (Figure 17).

La sortie indique que seulement quatre PCR ont fonctionné. Nous avons donc pu déterminer de façon précise la taille des inserts pour les colonies 61, 35 et 50. En effet, la sortie obtenue pour la colonie 29 présente deux pics. Ceci pourrait à nouveau provenir d'un mauvais prélèvement des bactéries lors de la préparation de la PCR. Il y aurait eu donc amplification de deux clones différents au lieu d'un. Signalons également que tous ces pics s'étendent de 280 à 480 pb. Or, nous avons prélevé, après crible sur gel d'agarose, des colonies portant des inserts de taille comprise entre 558 pb (800-242) et 758 pb (1000-242). Ceci pourrait vouloir dire qu'une analyse sur gel d'agarose du produit d'amplification par les amorces *forward reverse* n'est pas assez précise pour ce genre de crible.

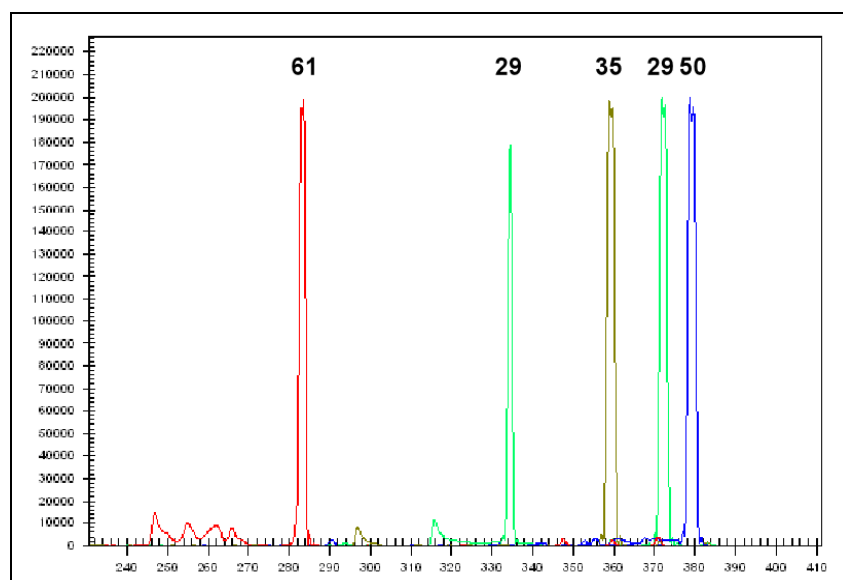


Figure 17 : Sorties AFLP sur ADNc superposées représentant les produits d'amplification sélective réalisée directement sur colonies à l'aide de la paire d'amorces marquée E04-M04. Sur les sept colonies testées, seulement quatre ont subi une amplification. Il est ainsi possible de déterminer la taille de l'insert de la colonie 61 (282 pb), de la colonie 35 (359 pb) et de la colonie 50 (379 pb). L'amplification réalisée à partir de la colonie 29 a généré deux amplicons, le premier est de 334 pb et le second est de 371 pb. L'axe des abscisses représente en pb la taille des fragments identifiés et l'axe des ordonnées représente une intensité de fluorescence émise par le fluorochrome porté par l'amorce E04.

Conclusion et perspectives

L'objectif de ce travail était, dans un premier temps, d'adapter au laboratoire une technique particulière d'étude différentielle de transcrits, l'AFLP-ADNc, et d'identifier par cette méthode récente, un ou plusieurs gènes différentiellement exprimés lors d'une élicitation aux oligogalacturonides de $DP \geq 9$.

L'AFLP sur ADNc est une technique relativement facile à mettre en œuvre et possédant l'avantage de ne nécessiter qu'une faible quantité de matériel de départ. Ses principaux inconvénients sont qu'elle ne permet pas d'effectuer une mesure quantitative du niveau de transcription puisqu'elle est fondée sur une amplification PCR et qu'elle ne permet pas l'identification directe d'un transcrit.

La séparation et la détection des TDF par électrophorèse capillaire sur analyseur de fragments permet également à la fois d'augmenter la qualité du travail (résolution plus importante, détermination précise de la taille de chaque TDF, aucun effet de bord rencontré avec des gels, programmes informatiques associés,...), de diminuer considérablement le temps de travail (pas de préparation fastidieuse de gel de séquençage, pas d'étape de nettoyage des puits, aucune étape d'excision périlleuse de bandes du gel,...) et enfin, de travailler sans faire intervenir la radioactivité (cfr toutes les mesures de protection éventuelles). Bref, cette technologie de séparation sur analyseur de fragments confère énormément d'avantages à ce type d'analyse AFLP.

Cependant, s'il fallait ne citer qu'un inconvénient à l'utilisation de l'analyseur de fragments, on mentionnerait le fait qu'il faille passer par une étape de criblage de banques de clones afin de retrouver un TDF particulier ayant été identifié sur la sortie AFLP-ADNc, alors qu'une séparation des fragments sur gel de séquençage permet d'identifier des TDF différentiellement présents et, après excision délicate de ces fragments du gel, de le cloner directement dans un plasmide.

La technique d'identification des pics a été validée au cours de ce travail, l'objectif premier de ce travail est donc atteint. En effet, il a été possible d'identifier, de cloner et de séquencer un TDF issu de la technique AFLP sur ADNc. Signalons toutefois que l'identification de la taille des inserts sur gel d'agarose après amplification des vecteurs pCR II via les amorces universelles *forward* et *reverse* ne s'est pas révélée être des plus appropriée. En effet, un tel type de gel ne permet pas, même à une concentration de 2 % en agarose, une bonne appréciation de la taille des fragments. Une migration de ces derniers sur un SDS-PAGE aurait sûrement permis une analyse plus précise du produit d'amplification PCR.

Cependant, il nous a été impossible de retrouver, parmi l'ensemble des clones obtenus après transformation, celui qui portait un TDF, ayant été identifié comme étant potentiellement réprimé après un traitement aux OGA. Signalons que nous n'avons pu identifier que deux TDF, parmi l'ensemble des sorties obtenues avec les différents couples d'amorces qui présentaient une différence de transcription de type tout ou rien après élicitation. Qui plus est, le niveau de fluorescence des pics leur étant associé était relativement faible.

Notre travail fut limité d'une part par le fait que nous nous soyons restreint à une gamme limitée de temps de stimulation (10 minutes, 30 minutes et 1 heure) et d'autre part, par l'adoption d'une stratégie de regroupement des échantillons stimulés pendant ces trois temps. Notre travail n'aurait donc pas pu fournir une analyse de la cinétique de l'expression

des gènes, mais plutôt une analyse différentielle de l'expression des gènes après une stimulation de durée déterminée. Des études faites sur des cellules de carottes également stimulées par des oligogalacturonides (Messiaen and Van Cutsem, 1993), ont montré que plusieurs gènes impliqués dans la synthèse de phytoalexine (PAL, 4CL), le gène SMS, le gène HRP, des gènes induits par l'éliciteur (ELI 12,0,7), ainsi que des gènes codant pour deux PR (PR1 et PR2), voient leur taux de transcription augmenté après 30 minutes de stimulation pour atteindre un maximum après six heures de traitement. Il est donc évident que l'expérience d'analyse des ADNc par AFLP devrait en toute logique être répétée de façon indépendante pour divers temps afin de couvrir l'ensemble des gènes activés par les oligogalacturonides aussi bien précocement que tardivement.

Par ailleurs, les TDF utilisés pour la validation présentaient une intensité de fluorescence très importante contrairement aux TDF identifiés comme étant différentiellement présents. Il conviendrait peut-être d'essayer d'identifier des pics montrant une fluorescence d'intensité plus importante. Quatre paires d'amorce différentes ont été utilisées lors de cette étude. Cependant, les résultats des tests préliminaires de sélection de paires d'amorces ont montré que d'autres couples auraient pu être utilisés. De plus, comme mentionné dans le chapitre résultats et discussion, la littérature cite l'utilisation d'autres enzymes de restriction (AseI,...). De nouvelles enzymes signifient également de nouveaux couples d'amorces et donc une augmentation des chances de repérer un fragment différentiellement présent dont l'intensité de fluorescence est acceptable.

Enfin, lorsque des gènes différentiellement transcrits auront été obtenus, une étude en PCR en temps réel viendrait compléter le travail effectué en caractérisant la cinétique transcriptionnelle de ces gènes.

Bibliographie

- Albersheim, P. et al. Plants interact with microbial polysaccharides. *J Supramol Struct* **6**, 599-616 (1977).
- Allan, A. C. & Fluhr, R. Two Distinct Sources of Elicited Reactive Oxygen Species in Tobacco Epidermal Cells. *Plant Cell* **9**, 1559-1572 (1997).
- Bachem, C. W. et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J* **9**, 745-53 (1996).
- Blein, J. P., Coutos-Thevenot, P., Marion, D. & Ponchet, M. From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends in Plant Science* **7**, 293-296 (2002).
- Bohlmann, H. The Role of Thionins in Plant-Protection. *Critical Reviews in Plant Sciences* **13**, 1-16 (1994).
- Bolwell, G. & Wojtaszek, P. Mechanisms for the generation of the reactive oxygen species in plant defence - a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **51**, 347-366 (1997).
- Bolwell, G. P. et al. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot* **53**, 1367-76 (2002).
- Carginale, V. et al. Identification of genes expressed in response to phytoplasma infection in leaves of *Prunus armeniaca* by messenger RNA differential display. *Gene* **332**, 29-34 (2004).
- Chen, X. P. et al. Isolation and characterization of triacontanol-regulated genes in rice (*Oryza sativa* L.): Possible role of triacontanol as a plant growth stimulator. *Plant and Cell Physiology* **43**, 869-876 (2002).
- Chetverin, A. B. & Kramer, F. R. Oligonucleotide arrays: new concepts and possibilities. *Biotechnology (N Y)* **12**, 1093-9 (1994).
- Christensen, A. B. et al. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology* **3**, 135-144 (2002).
- Cote, F. & Hahn, M. G. Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Mol Biol* **26**, 1379-411 (1994).
- Darvill, A. G. et al. Structure and function of plant cell wall polysaccharides. *J Cell Sci Suppl* **2**, 203-17 (1985).
- Decreux, A. & Messiaen, J. Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation. *Plant and Cell Physiology* **46**, 268-278 (2005).
- del Rio, L. et al. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* **53** (2002).
- Delmer, D. P. & Amor, Y. Cellulose biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 987-1000 (1995).
- Desprez, T., Amselem, J., Caboche, M. & Hofte, H. Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays. *Plant J* **14**, 643-52 (1998).
- Diatchenko, L. et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 6025-6030 (1996).
- Durrant, W. E., Rowland, O., Piedras, P., Hammond-Kosack, K. E. & Jones, J. D. G. cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* **12**, 963-977 (2000).

- Eckey, C. et al. Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase. *Plant Molecular Biology* **55**, 1-15 (2004).
- Epstein, E. Silicon. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 641-664 (1999).
- Esquerre-Tugaye, M. T. [Plants and pathogenic agents, a refined and dangerous relationship: the example of fungi]. *C R Acad Sci III* **324**, 899-903 (2001).
- Fry, S. C. Polysaccharide-Modifying Enzymes in the Plant-Cell Wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**, 497-520 (1995).
- Goupil, P. et al. cDNA-AFLP display for the isolation of differentially expressed genes during chicory root development. *Journal of Plant Physiology* **160**, 303-309 (2003).
- Ha, M. A., Apperley, D. C. & Jarvis, M. C. Molecular Rigidity in Dry and Hydrated Onion Cell Walls. *Plant Physiol* **115**, 593-598 (1997).
- Hahn, M. G., Darvill, A. G. & Albersheim, P. Host-pathogen interactions. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiology* **68**, 1161-1169 (1981).
- Harborne, J. B. Recent advances in chemical ecology. *Nat Prod Rep* **16**, 509-23 (1999).
- Hayashi, T. Xyloglucans in the Primary-Cell Wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 139-168 (1989).
- He, Z. H., He, D. Z. & Kohorn, B. D. Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response. *Plant Journal* **14**, 55-63 (1998).
- Hinderhofer, K. & Zentgraf, U. Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Planta* **213**, 469-73 (2001).
- Huisman, M. M. H. et al. The CDTA-soluble pectic substances from soybean meal are composed of rhamnogalacturonan and xylogalacturonan but not homogalacturonan. *Biopolymers* **58**, 279-294 (2001).
- Ishii, T. Pectic Polysaccharides from Bamboo Shoot Cell-Walls. *Mokuzai Gakkaishi* **41**, 669-676 (1995).
- Ishii, T. O-acetylated oligosaccharides from pectins of potato tuber cell walls. *Plant Physiol* **113**, 1265-72 (1997).
- Jose-Estanyol, M. & Puigdomenech, P. Plant cell wall glycoproteins and their genes. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 97-108 (2000).
- Jung, S. H., Lee, J. Y. & Lee, D. H. Use of SAGE technology to reveal changes in gene expression in Arabidopsis leaves undergoing cold stress. *Plant Mol Biol* **52**, 553-67 (2003).
- Kauss, H. et al. Silica deposition by a strongly cationic proline-rich protein from systemically resistant cucumber plants. *Plant J* **33**, 87-95 (2003).
- Keegstra, K., Talmadge, K. W., Bauer, W. D. & Albersheim, P. The structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiology* **51**, 188-196 (1973).
- Kemp, B. P., Beeching, J. R. & Cooper, R. M. cDNA-AFLP reveals genes differentially expressed during the hypersensitive response of cassava. *Molecular Plant Pathology* **6**, 113-123 (2005).
- Kombrink, E. & Somssich, I. in *The mycota V, Part A. Plant Relationships* (Springer Verlag, Berlin, 1997).

- Kozian, D. H. & Kirschbaum, B. J. Comparative gene-expression analysis. *Trends Biotechnol* **17**, 73-8 (1999).
- Lamb, C. & Dixon, R. A. The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 251-275 (1997).
- Liang, P. & Pardee, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-71 (1992).
- Liners, F., Thibault, J. F. & Vancutsem, P. Influence of the Degree of Polymerization of Oligogalacturonates and of Esterification Pattern of Pectin on Their Recognition by Monoclonal-Antibodies. *Plant Physiology* **99**, 1099-1104 (1992).
- Linthorst, H. J. M. Pathogenesis-Related Proteins of Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **10**, 123-150 (1991).
- Luderer, R. & Joosten, M. H. Avirulence proteins of plant pathogens : determinants of victory and defeat. *Molecular Plant Pathology* **2**, 355-364 (2001).
- Mathieu, Y. & Guern, J. Fast Responses of Plant-Cells to Cell Wall-Derived Signals. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **201**, 21-Carb (1991).
- Matsumura, H., Terauchi, R. & Saitoh, H. Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) of Magnaporthe grisea: genes involved in appressorium formation. *Mol Genet Genomics* **270**, 181-9 (2003).
- Mccann, M. C., Wells, B. & Roberts, K. Complexity in the Spatial Localization and Length Distribution of Plant Cell-Wall Matrix Polysaccharides. *Journal of Microscopy-Oxford* **166**, 123-136 (1992).
- Menges, M. & Murray, J. A. H. Synchronous Arabidopsis suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant Journal* **30**, 203-212 (2002).
- Messiaen, J. & Vancutsem, P. Pectic Signal-Transduction in Carrot Cells - Membrane, Cytosolic and Nuclear Responses Induced by Oligogalacturonides. *Plant and Cell Physiology* **35**, 677-689 (1994).
- Moiseyev, G. P., Beintema, J. J., Fedoreyeva, L. I. & Yakovlev, G. I. High Sequence Similarity between a Ribonuclease from Ginseng Calluses and Fungus-Elicited Proteins from Parsley Indicates That Intracellular Pathogenesis-Related Proteins Are Ribonucleases. *Planta* **193**, 470-472 (1994).
- Morris, E. R., Powell, D. A., Gidley, M. J. & Rees, D. A. Conformations and interactions of pectins. I. Polymorphism between gel and solid states of calcium polygalacturonate. *J Mol Biol* **155**, 507-16 (1982).
- Narita, Y. et al. Characterization of the salt-inducible methionine synthase from barley leaves. *Plant Science* **167**, 1009-1016 (2004).
- Penel, C., Van Cutsem, P. & Greppin, H. Interactions of a plant peroxidase with oligogalacturonides in the presence of calcium ions. *Phytochemistry* **51**, 193-198 (1999).
- Perez, S., Rodriguez-Carvajal, M. A. & Doco, T. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie* **85**, 109-21 (2003).
- Perrone, P. et al. Patterns of methyl and O-acetyl esterification in spinach pectins: new complexity. *Phytochemistry* **60**, 67-77 (2002).
- Powell, D. A., Morris, E. R., Gidley, M. J. & Rees, D. A. Conformations and interactions of pectins. II. Influences of residue sequence on chain association in calcium pectate gels. *J Mol Biol* **155**, 517-31 (1982).

- Reymond, P. et al. Cloning of a cDNA encoding a plasma membrane-associated, uronide binding phosphoprotein with physical properties similar to viral movement proteins. *Plant Cell* **8**, 2265-76 (1996).
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A. & Mohnen, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**, 929-67 (2001).
- Ros Barcelo, A. Lignification in plant cell walls. *International Reviews of Cytology* **176**, 87-132 (1997).
- Ryan, C. Protease inhibitors in plants : gene for improving defenses against insects and pathofens. *Annual Review of Phytopathology* **28**, 425-449 (1990).
- Scheel, D. in *Oxidative Stress in Plants* (ed. Inze D, V. M. M.) 137-153 (Taylor & Francis, New York, 2002).
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-70 (1995).
- Simões-Araújo, J. et al. Identification of differentially expressed genes by cDNA-AFLP technique during heat stress in cwpea nodules. *FEBS Letters* **512**, 44-50 (2002).
- Simpson, S. D., Ashford, D. A., Harvey, D. J. & Bowles, D. J. Short chain oligogalacturonides induce ethylene production and expression of the gene encoding aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase in tomato plants. *Glycobiology* **8**, 579-583 (1998).
- Smith, C. J. Accumulation of phytoalexins: Defence mechanism and stimulus response system. *New Phytologist* **132**, 1-45 (1996).
- Takken, F. L. et al. A functional cloning strategy, based on a binary PVX-expression vector, to isolate HR-inducing cDNAs of plant pathogens. *Plant J* **24**, 275-83 (2000).
- Talbott, L. D. & Ray, P. M. Molecular-Size and Separability Features of Pea Cell-Wall Polysaccharides - Implications for Models of Primary Wall Structure. *Plant Physiology* **98**, 357-368 (1992).
- Tamborindeguy, C., Ben, C., Jardinaud, F., Gentzbittel, L. & Liboz, T. Mass cloning of differential and nondifferential transcript-derived fragments from cDNA-AFLP experiments in sunflower. *Plant Molecular Biology Reporter* **22**, 165-171 (2004).
- Tenhaken, R. & Rubel, C. Induction of alkalization and an oxidative burst by low doses of cycloheximide in soybean cells. *Planta* **206**, 666-672 (1998).
- Umezawa, T., Mizuno, K. & Fujimura, T. Discrimination of genes expressed in response to the ionic or osmotic effect of salt stress in soybean with cDNA-AFLP. *Plant Cell and Environment* **25**, 1617-1625 (2002).
- Urban, P., Mignotte, C., Kazmaier, M., Delorme, F. & Pompon, D. Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-Cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 19176-19186 (1997).
- van Loon, L. C. & van Kammen, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* **40**, 190-211 (1970).
- van Loon, L. C. & Van Strien, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**, 85-97 (1999).

- VanEtten, H. D., Matthews, D. E. & Matthews, P. S. Phytoalexin Detoxification - Importance for Pathogenicity and Practical Implications. *Annual Review of Phytopathology* **27**, 143-164 (1989).
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Serial analysis of gene expression. *Science* **270**, 484-7 (1995).
- Vigers, A. J., Roberts, W. K. & Selitrennikoff, C. P. A New Family of Plant Antifungal Proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **4**, 315-323 (1991).
- Vincken, J. P. et al. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology* **132**, 1781-1789 (2003).
- Visser, J. & Voragen, A. G. J. Pectins and pectinases, progress in biotechnology. *Elsevier* **14** (1996).
- Vorwerk, S., Somerville, S. & Somerville, C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci* **9**, 203-9 (2004).
- Vos, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* **23**, 4407-14 (1995).
- Wagner, T. A. & Kohorn, B. D. Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. *Plant Cell* **13**, 303-318 (2001).
- Wei, Y. et al. An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Mol Biol* **36**, 101-12 (1998).
- Zhang, Z. G., Collinge, D. B. & Thordalchristensen, H. Germin-Like Oxalate Oxidase, a H₂O₂-Producing Enzyme, Accumulates in Barley Attacked by the Powdery Mildew Fungus. *Plant Journal* **8**, 139-145 (1995).
- Zhang, L., Meakin, H. & Dickinson, M. Isolation of genes expressed during compatible interactions between leaf rust (*Puccinia triticina*) and wheat using cDNA-AFLP. *Molecular Plant Pathology* **4**, 496-477 (2003).